

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Dagmar Hulová

**Využití elektrodových materiálů na bázi rtuti ke studiu  
elektrochemické redukce vybraných žlučových kyselin**

The use of mercury-based electrode materials for the study  
of electrochemical reduction of selected bile acids

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Karolina Schwarzová, Ph.D.

Praha 2015

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti řešení projektu Univerzitního centra excelence UNCE „Supramolekulární chemie“.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 1. června 2015.

## Abstrakt

Bylo studováno elektrochemické chování žlučových kyselin (kyseliny cholové, glykocholové, deoxycholové, ursodeoxycholové a lithocholové) na rtuťovém meniskem modifikované tuhé stříbrné amalgámové elektrodě (m-AgSAE) metodou diferenční pulzní voltametrie. Žlučové kyseliny poskytují v roztoku Brittonova – Robinsonova pufru a methanolu (9:1) v rozmezí pH 3,0 až 12,0 katodický signál v oblasti vysoce záporných potenciálů: kyselina cholová, deoxycholová, ursodeoxycholová a lithocholová okolo  $-1400$  mV a kyselina glykocholová, která je jediná konjugátem s glycinem, okolo  $-1500$  mV. Kyseliny cholová, glykocholová, deoxycholová a ursodeoxycholová poskytují nejvyšší píky do pH 5,0, tedy přibližně do hodnoty jejich  $pK_a$ . Kyselina lithocholová poskytuje píky od pH 7,0. Cyklickou voltametrií bylo dokázáno, že elektrochemické chování je ovlivněno adsorpcí žlučových kyselin na elektrodu; předpokládaná reakce na pracovní elektrodě – redukce protonu karboxylové skupiny, je řízena difúzí a děj je quasireversibilní. Využití elektrochemické redukce žlučových kyselin pro jejich voltametrické stanovení se nejeví jako příliš vhodné.

Pro kyselinu glykocholovou bylo dokázáno, že přítomnost methanolu zhoršuje výsledky měření. V přítomnosti tetrahydrofuranu je na m-AgSAE pro metodu diferenční pulzní voltametrie mez detekce  $1,65 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Chování kyseliny glykocholové bylo studováno také měřením na visící rtuťové kapkové elektrodě. Na rozdíl od m-AgSAE je signál poskytován až od pH 5,0.

Provedením potenciostatické elektrolýzy bylo dokázáno, že na rtuťovém dně nedochází při potenciálu odpovídajícím katodické redukci k rozkladu kyseliny glykocholové. Kyselina má katalytický účinek při předpokládané redukci protonu karboxylové skupiny. Kvantifikace byla provedena metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s obrácenými fázemi s UV detekcí při 210 nm. Pro tuto metodu je mez detekce  $1,46 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$

## Abstract

The electrochemical behaviour of the bile acids (cholic, glycocholic, deoxycholic, ursodeoxycholic and lithocholic acid) was studied on the meniscus-modified silver solid amalgam electrode (m-AgSAE) by differential pulse voltammetry. Bile acids provide in the solution of the Britton – Robinson buffer and methanol (9:1) in the pH range 3.0 to 12.0 a cathodal signal in the high negative potentials: cholic acid, deoxycholic acid, ursodeoxycholic acid and lithocholic acid about  $-1400$  mV and glycocholic acid, which alone is the conjugate with glycine, about  $-1500$  mV. Cholic acid, glycocholic acid, deoxycholic acid and ursodeoxycholic acid provide the highest peaks to pH 5.0, approximately in their pKa values. Lithocholic acid provides peaks from pH 7.0. It was demonstrated by the cyclic voltammetry that the electrochemical behavior is influenced by the adsorption of the bile acids to the electrode; presumed reaction at the working electrode – a reduction of a proton of a carboxylic group, is controlled by the diffusion and the process is quasireversible. Utilization of the electrochemical reduction of bile acids for the voltammetric determination does not seem very suitable.

It has been proven that the presence of the methanol deteriorates the measuring results for glycocholic acid. In the presence of tetrahydrofuran is the limit of the detection on m-AgSAE  $1.65 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  for differential pulse voltammetry. Glycocholic behavior have been investigated by measurements on hanging mercury drop electrode. Unlike the m-AgSAE signal is provided from a pH 5.0.

It was shown that at the mercury pool electrode does not occur at a potential corresponding to the reduction of the cathodic decomposition of glycocholic acid by the performing of the potentiostatic electrolysis. The acid has a catalytic effect upon the anticipated reduction of a proton of a carboxylic group. Quantification was performed by the reversed-phase high-performance liquid chromatography with UV detection at 210 nm. For this method the detection limit was  $1.46 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$

**Klíčová slova**

Cyklická voltametrie, elektrochemická redukce, rtuťová visící kapková elektroda, stříbrná tuhá amalgámová elektroda, žlučové kyseliny.

**Key words**

Cyclic voltammetry, electrochemical reduction, hanging mercury drop electrode, silver solid amalgam electrode, bile acids.

## **Poděkování**

Ráda bych tímto poděkovala své školitelce, paní RNDr. Karolině Schwarzové, Ph.D. za ochotu, trpělivost, cenné rady a pomoc při vypracovávání této práce. Dále bych ráda poděkovala kolektivům laboratoří číslo 110 a 113. V neposlední řadě patří mé poděkování rodičům, rodině, příteli a přátelům za veškerou podporu.

## Obsah

<b>Seznam zkratk</b>	9
<b>1. Teoretický úvod</b>	11
1.1 Cíl práce	11
1.2 Žlučové kyseliny	12
1.2.1 Historie a obecné vlastnosti	12
1.2.2 Fyzikálně chemické vlastnosti vybraných žlučových kyselin	14
1.2.2.1 Kyselina cholová	15
1.2.2.2 Kyselina glykocholová	16
1.2.2.3 Kyselina deoxycholová	17
1.2.2.4 Kyselina ursodeoxycholová	18
1.2.2.5 Kyselina lithocholová	19
1.3 Analytické metody pro důkaz a stanovení žlučových kyselin	20
1.3.1 Chromatografické metody	20
1.3.2 Elektroanalytické metody a senzory	22
1.4 Voltametrické metody	24
1.4.1 Stacionární (Direct current) voltametrie (DCV)	24
1.4.2 Cyklická voltametrie (CV)	24
1.4.3 Diferenční pulzní voltametrie (DPV)	25
1.5 Stacionární elektrody na bázi rtuti	25
1.5.1 Visící rtuťová kapková elektroda	25
1.5.2 Rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgámová elektroda	26
<b>2. Experimentální část</b>	27
2.1 Studované látky	27
2.2 Použité chemikálie	27
2.3 Příprava roztoků	27
2.3.1 Zásobní roztoky žlučových kyselin	27
2.3.2 Pufrý	28
2.4 Metody měření a přístroje	28
2.4.1 Voltametrická měření	28

2.4.2 Potenciostatická coulometrie .....	29
2.4.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi s UV detekcí .....	30
<b>2.5 Zpracování dat</b> .....	30
<b>3. Výsledky a diskuze</b> .....	32
<b>3.1 Rtuťovým meniskem modifikovaná tuhá stříbrná amalgámová elektroda</b> .....	32
3.1.1 pH závislost .....	32
3.1.2 Studium povahy elektrochemických dějů pomocí cyklické voltametrie .....	40
3.1.3 Možnosti stanovení kyseliny glykocholové .....	49
3.1.3.1 Koncentrační závislost v přítomnosti methanolu v roztoku .....	49
3.1.3.2 Vliv množství methanolu na výsledek měření .....	51
3.1.3.3 Koncentrační závislost v nepřítomnosti methanolu v roztoku ...	53
3.1.3.4 Vliv přítomnosti kyseliny glykocholové na elektrochemickou odezvuredoxního markeru .....	55
<b>3.2 Visící rtuťová kapková elektroda</b> .....	56
3.2.1 DP voltametrie kyseliny glykocholové .....	56
3.2.2 Studium povahy dějů pomocí cyklické voltametrie .....	60
<b>3.3 Elektrolýza a RP-HPLC s UV detekcí kyseliny glykocholové</b> .....	65
<b>4. Závěr</b> .....	69
<b>Literatura</b> .....	74



## Seznam zkratek

<i>A</i>	plocha elektrody (cm <sup>2</sup> )
BR pufr	Brittonův – Robinsonův pufr
<i>c</i>	molární koncentrace (mol·l <sup>-1</sup> )
C <sub>24</sub>	žlučové kyseliny s celkovým počtem uhlíků 24
C <sub>27</sub>	žlučové kyseliny s celkovým počtem uhlíků 27
C <sub>18</sub>	oktadecylová stacionární fáze
CA	kyselina cholová
C.A.S.	Chemical Abstract Service
CEC	kapilární elektrochromatografie
pCEC	tlaková kapilární elektrochromatografie
CMC	kritická micelární koncentrace
CV	cyklická voltametrie
CZE	kapilární zónová elektroforéza
<i>D</i>	difúzní koeficient analytu (cm <sup>2</sup> ·s <sup>-1</sup> )
DCA	kyselina deoxycholová
DCV	stacionární (direct current) voltametrie
DME	kapající rtuťová elektroda
DPV	diferenční pulzní voltametrie
<i>E</i>	potenciál
<i>E<sub>p</sub></i>	potenciál v maximu výšky píku
<i>E<sub>p, a</sub></i>	potenciál anodického píku
<i>E<sub>p, k</sub></i>	potenciál katodického píku
<i>E<sub>lim</sub></i>	limitní potenciál
ED	elektrochemický detektor
GCA	kyselina glykocholová
GLC	plynová rozdělovací chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda
<i>I, i</i>	proud
<i>I<sub>p</sub></i>	proud píku

$I_{p, a}$	proud anodického píku
$I_{p, k}$	proud katodického píku
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
LC	kapalinová chromatografie
LCA	kyselina lithocholová
m-AgSAE	rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgámová elektroda
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
$n$	počet vyměňovaných elektronů při elektrochemické reakci
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity vodíkových iontů
pKa	záporný dekadický logaritmus kyselé disociační konstanty
$r$	poloměr elektrody (cm)
RP-TLC	chromatografie na tenké vrstvě s obrácenými fázemi
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi
$t$	čas
THF	tetrahydrofuran
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
UDCA	kyselina ursodeoxycholová
UV	ultra fialová (oblast detekce)
$v$	rychlost scanu ( $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ )
$\psi$	funkce potenciálu závislá na podmínkách měření

## 1. Teoretický úvod

### 1.1 Cíl práce

Tato práce je součástí širšího výzkumného projektu, který se zabývá studiem elektrochemického chování přírodních steroidních sloučenin (např. žlučových kyselin, fytoosterolů) za účelem studia jejich supramolekulárních interakcí a interakcí konjugátů, které se z těchto molekul připravují. Součástí projektu je i studium možností využití elektrochemické oxidace a redukce steroidních sloučenin v elektroanalýze.

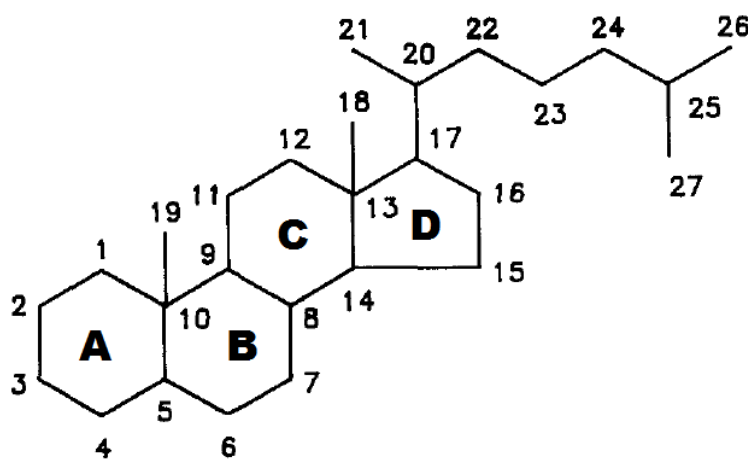
Cílem této diplomové práce bylo studium elektrochemické redukce vybraných žlučových kyselin (kyselina cholová – CA, kyselina glykocholová – GCA, kyselina deoxycholová – DCA, kyselina ursodeoxycholová – UDCA a kyselina lithocholová – LCA) na meniskem modifikované stříbrné tuhé amalgámové elektrodě (m-AgSAE) pomocí voltametrických metod: diferenční pulzní voltametrie (DPV) a stacionární voltametrie (DCV) a ověření možností jejich využití k voltametrickému stanovení těchto látek. Cyklická voltametrie (CV) a potenciostatická elektrolýza byly použity k určení charakteru elektrochemického děje probíhajícího na elektrodě. Pozornost byla věnována vlivu pH a vlivu organických rozpouštědel použitých pro přípravu zásobních roztoků žlučových kyselin na výsledek měření a ovlivnění katodického úniku elektrolytu přítomností žlučových kyselin. Dále pro kyselinu glykocholovou byly výsledky měření na m-AgSAE porovnány s elektrochemickým chováním na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE).

## 1.2 Žlučové kyseliny

### 1.2.1 Historie a obecné vlastnosti

Žlučové kyseliny jsou studovány již od počátku devatenáctého století. K objasnění jejich struktury ale dochází až po roce 1932, kdy byla pomocí rentgenových paprsků objasněna struktura cholesterolu. Výzkum na současné vědecké úrovni začal v padesátých letech dvacátého století. Vzhledem k pozdějšímu objasnění struktury nese většina žlučových kyselin název ne dle struktury, ale podle organismu, ve kterém byla objevena. Například kyselina ursodeoxycholová: *ursus* (latinsky) – medvěd [1, 2].

Žlučové kyseliny jsou syntetizovány množstvím kroků z cholesterolu a jsou jednou ze složek žluči. Základem všech žlučových kyselin je steroidní jádro, tvořeno třemi šestiuhlíkatými kruhy (A, B a C) a jedním pětiuhlíkatým (D), a krátký alifatický postranní řetězec (obr. 1.1). Kruhy A a B vůči sobě zaujímají *cis* nebo *trans* konfiguraci. V poloze 18 a 19 jsou vázány methylové skupiny. Jednotlivé žlučové kyseliny se od sebe liší pozicí a množstvím hydroxylových skupin (u savců nejčastěji na pozici 3, 7 a 12) a délkou postranního řetězce. Většina žlučových kyselin tvoří konjugáty s glycinem nebo taurinem [1, 3, 4].



**Obr. 1.1:** Základ struktury žlučových kyselin – systém značení kruhů steroidního jádra a číslování jednotlivých pozic atomů uhlíku [1, 4].

Jsou známy dvě největší skupiny žlučových kyselin: žlučové kyseliny s celkovým počtem uhlíků dvacet čtyři ( $C_{24}$ ) nazývané cholanové a s celkovým počtem uhlíků dvacet sedm ( $C_{27}$ ) nazývané cholestanové. U savců výrazně převažují  $C_{24}$  žlučové kyseliny, které se u člověka vyskytují téměř vždy konjugované s taurinem či glycinem [1, 3, 5].

Žlučové kyseliny syntetizované v játrech jsou nazývány primárními žlučovými kyselinami. Z primárních žlučových kyselin mohou vznikat bakteriální modifikací žlučové kyseliny označované jako sekundární. Žlučové kyseliny jsou důležité pro emulgaci kapiček tuků z potravy tvorbou smíšených micel, které zvětšují plochu tuku a usnadňují přístup lipasam. Dále jsou zodpovědné za rozpouštění a absorpci vitamínů rozpustných v tucích [1, 3, 5].

Žlučové kyseliny jsou amfipatické molekuly; obsahují hydrofobní i hydrofilní část. Jejich hydrofilie klesá v řadě: kyselina ursodeoxycholová > kyselina cholová > kyselina deoxycholová > kyselina lithocholová a konjugáty taurinu > konjugáty glycinu [1, 3, 5]. Jejich rozpustnost ve vodě je zpravidla v rozmezí 0,05 až 300  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Anionty žlučových kyselin tvoří ve vodném prostředí a v poměrně úzkém koncentračním rozsahu micely. Průměrná hodnota tohoto rozsahu je označována jako kritická micelární koncentrace (CMC). Pro  $C_{24}$  žlučové kyseliny platí, že látky mající dvě hydroxylové skupiny mají nižší hodnotu CMC než látky se třemi hydroxylovými skupinami. To souvisí i s jejich nižší rozpustností. Konjugace s glycinem či taurinem vede k nepatrnému snížení hodnoty CMC [1, 5].

Jinak je tomu u hodnot  $pK_a$ . Hodnota  $pK_a$  většiny žlučových kyselin se pohybuje kolem hodnoty pět. Konjugované žlučové kyseliny mají  $pK_a$  výrazně nižší vlivem záporného indukčního efektu karbonylové skupiny na amidové vazbě [2].

Konkrétní hodnoty rozpustnosti ve vodě, CMC a  $pK_a$  jsou pro studované žlučové kyseliny shrnuty v tab. 1.1.

Žlučové kyseliny jsou schopné tvořit supramolekuly. Pro většinu žlučových kyselin je typická *cis* konfigurace A a B kruhu steroidního jádra. Řetězec žlučových kyselin s touto konfigurací označovaných také jako  $5\beta$  žlučové kyseliny má zakřivený charakter, který umožňuje spojení několika žlučových kyselin do kruhu. Ke spojení dochází pomocí takzvaných spacerů. Spacer je navázán na steroidní kruh první žlučové kyseliny do polohy 3 a spojen s alifatickým řetězcem druhé žlučové kyseliny. Stejným

způsobem je navázána druhá žlučová kyselina k první (pokud je supramolekula tvořena jen ze dvou molekul žlučových kyselin), čímž jsou obě molekuly spojeny do supramolekuly. Pomocí supramolekulárních interakcí žlučových kyselin nebo jejich konjugátů tak mohou vznikat např. organizované útvary s kanálkem uprostřed, kam lze navázat hydrofilní látku, kterou je pak možno přepravit přes lipidovou dvojvrstvu membrán. Toho lze využít např. pro transport léčiv v organismech [6, 7].

Žlučové kyseliny mají své využití ve farmakologii při nedostatečné tvorbě žlučových kyselin, onemocněních jater, rozpouštění žlučových kamenů. Pro své vlastnosti jsou zkoumány jako možná léčiva proti plísním, nosiče pro specifická jaterní léčiva nebo léčiva ke snížení hladiny cholesterolu. Mluví se o možnosti využití jako antivirotik (konkrétně proti gramnegativním bakteriím), neopiátových analgetik, radiofarmak [8].

### 1.2.2 Fyzikálně chemické vlastnosti vybraných žlučových kyselin

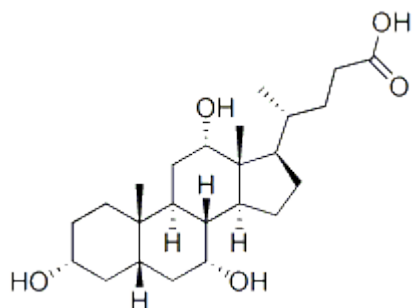
Některé z fyzikálně chemických vlastností studovaných žlučových kyselin popisuje tab. 1.1.

**Tab. 1.1:** Hodnoty rozpustnosti ve vodě, kritické micelární koncentrace (CMC) a pKa pro kyselinu cholovou (CA), glykocholovou (GCA), deoxycholovou (DCA), ursodeoxycholovou (UDCA) a lithocholovou (LCA).

Žlučová kyselina	Rozpustnost ve vodě ( $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )	CMC ve vodě ( $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ )	pKa
CA	273 <sup>[9]</sup>	13 <sup>[9]</sup>	5,2 <sup>[11]</sup>
GCA	32 <sup>[9]</sup>	12 <sup>[9]</sup>	3,8 <sup>[11]</sup>
DCA	28 <sup>[9]</sup>	10 <sup>[9]</sup>	6,2 <sup>[11]</sup>
UDCA	9 <sup>[9]</sup>	19 <sup>[9]</sup>	5,1 <sup>[12]</sup>
LCA	0,05 <sup>[10]</sup>	0,9 <sup>[10]</sup>	4,8 <sup>[13]</sup>

### 1.2.2.1 Kyselina cholová

Strukturní vzorec kyseliny cholové (CA) je zobrazen na obr. 1.2. Charakteristické vlastnosti a konkrétní možnosti využití CA jsou shrnuty v tab. 1.2.



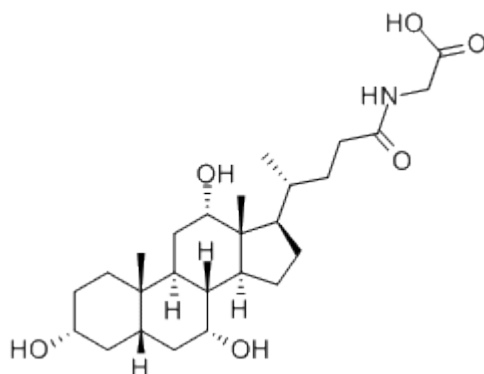
**Obr. 1.2:** Strukturní vzorec kyseliny cholové [14].

**Tab.1.2:** Tabulka vlastností kyseliny cholové [14 – 16].

Anglický název	Cholic acid
Název dle IUPAC	(4R)-4-[(3R,5S,7R,8R,9S,10S,12S,13R,14S,17R)-3,7,12-trihydroxy-10,13-dimethyl-2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]pentanoic acid
Číslo v C.A.S.	81-25-4
Sumární vzorec	$C_{24}H_{40}O_5$
Molekulová hmotnost	$408,5714 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
Teplota tání	$198 \text{ }^{\circ}\text{C}$
Barva	Bílý až světle béžový krystalický prášek
Využití	Terapie astmatu; léčba poruch syntézy žlučových kyselin způsobených vadou jednoho enzymu a peroxisomálních poruch (Zellwegerův syndrom)

### 1.2.2.2 Kyselina glykocholová

Strukturní vzorec kyseliny glykocholové (GCA) je zobrazen na obr. 1.3. Charakteristické vlastnosti GCA jsou shrnuty v tab. 1.3.



**Obr. 1.3:** Strukturní vzorec kyseliny glykocholové [17].

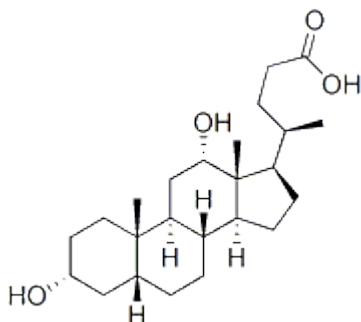
**Tab.1.3:** Tabulka vlastností kyseliny glykocholové [17 – 19].

Anglický název	Glycocholic acid
Název dle IUPAC	2-[[[(4R)-4-[(3R,5S,7R,8R,9S,10S,12S,13R,14S,17R)-3,7,12-trihydroxy-10,13-dimethyl-2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]pentanoyl]amino]acetic acid
Číslo v C.A.S.	475-31-0
Sumární vzorec	$C_{26}H_{43}NO_6$
Molekulová hmotnost	$465,62272 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Teplota tání	$166,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$
Barva	Bílý prášek



### 1.2.2.3 Kyselina deoxycholová

Strukturní vzorec kyseliny deoxycholové (DCA) je zobrazen na obr. 1.4. Charakteristické vlastnosti a konkrétní možnosti využití DCA jsou shrnuty v tab. 1.4.



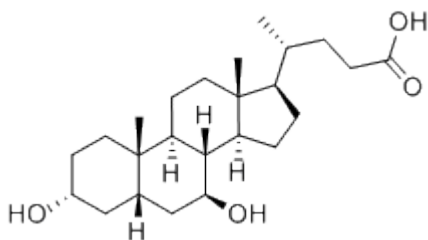
**Obr. 1.4:** Strukturní vzorec kyseliny deoxycholové [20].

**Tab.1.4:** Tabulka vlastností kyseliny deoxycholové [20 – 22].

Anglický název	Deoxycholic acid
Název dle IUPAC	(4R)-4-[(3R,5R,8R,9S,10S,12S,13R,14S,17R)-3,12-dihydroxy-10,13-dimethyl-2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]pentanoic acid
Číslo v C.A.S.	83-44-3
Sumární vzorec	$C_{24}H_{40}O_4$
Molekulová hmotnost	$392,572 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Teplota tání	$176 - 178 \text{ }^{\circ}\text{C}$
Barva	Bílý prášek
Využití	Imunomodulátory, protizánětlivé látky, antineoplastické látky, choleretikum

#### 1.2.2.4 Kyselina ursodeoxycholová

Strukturní vzorec kyseliny ursodeoxycholové (UDCA) je zobrazen na obr. 1.5. Charakteristické vlastnosti a konkrétní možnosti využití UDCA jsou shrnuty v tab. 1.5.



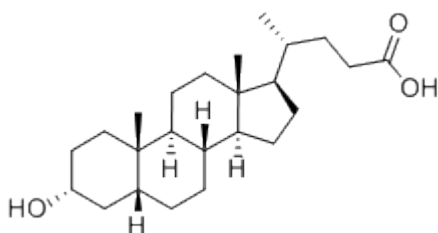
**Obr.1.5:** Strukturní vzorec kyseliny ursodeoxycholové [23].

**Tab.1.5:** Tabulka vlastností kyseliny ursodeoxycholové [12, 23 – 25].

Anglický název	Ursodeoxycholic acid
Název dle IUPAC	(4R)-4-[(3R,5S,7S,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-3,7-dihydroxy-10,13-dimethyl-2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]pentanoic acid
Číslo v C.A.S.	128-13-2
Sumární vzorec	$C_{24}H_{40}O_4$
Molekulová hmotnost	$392,572 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Teplota tání	203 °C
Barva	Bílý krystalický prášek
Využití	Cholagogum, choleretikum

### 1.2.2.5 Kyselina lithocholová

Strukturní vzorec kyseliny lithocholové (LCA) je zobrazen na obr. 1.6. Charakteristické vlastnosti LCA jsou shrnuty v tab. 1.6.



**Obr.1.6:** Strukturní vzorec kyseliny lithocholové [26].

**Tab.1.6:** Tabulka vlastností kyseliny lithocholové [26, 27].

Anglický název	Lithocholic acid
Název dle IUPAC	(4R)-4-[(3R,5R,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-3-hydroxy-10,13-dimethyl-2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]pentanoic acid
Číslo v C.A.S.	434-13-9
Sumární vzorec	$C_{24}H_{40}O_3$
Molekulová hmotnost	$376,5726 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Teplota tání	184 – 186 °C
Barva	Bílý prášek

### 1.3 Analytické metody pro důkaz a stanovení žlučových kyselin

V tělních tekutinách jsou žlučové kyseliny obsaženy v mikromolárních množstvích, což stěžuje jejich stanovení oproti laboratorním podmínkám. Pro jejich separaci a detekci bylo zkoumáno množství různých metod [28]. Problémem pro separaci a detekci těchto látek je zpravidla jejich nízká absorpance v UV oblasti, malá těkavost a vysoké redoxní potenciály pro elektrochemickou oxidaci, nebo redukci, které omezují využití běžnějších analytických metod (např. HPLC-UV), či vyžadují derivatizaci kyselin v průběhu analýzy a použití instrumentálně a finančně náročnějších detekčních systémů, např. hmotnostní spektrometry.

#### 1.3.1 Chromatografické metody

Původně byla používána chromatografie na tenké vrstvě – klasická (TLC), či s obrácenou fází (RP-TLC). Nevýhoda této metody spočívala v neschopnosti od sebe rozlišit taurinové a glycinové konjugáty [29]. Nejběžněji používanou metodou se stala v minulosti plynová rozdělovací chromatografie (GLC) a její kombinace s hmotnostní spektrometrií (GLC-MS) [29, 30]. Její důležitost klesla s nástupem kapalinové chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) a tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS), která je citlivější. Přesto lze z GLC-MS oproti LC-MS obdržet lepší informace o struktuře. S nástupem vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) se GLC-MS dostala do pozadí úplně. Dnes je HPLC v kombinaci s různými detektory nejčastěji používanou metodou k separaci. Jde o metodu, jež umožňuje analyzovat žlučové kyseliny v biologických materiálech. Používána je oktadecylová ( $C_{18}$ ) stacionární fáze. Retence nekonjugovaných a glycinem konjugovaných žlučových kyselin v koloně vzrůstá s klesajícím pH od 7,5 do 2,5. K eluci dochází v pořadí: taurinové konjugáty < glycinové konjugáty < nekonjugované žlučové kyseliny [28 – 30].

Nejběžnější metodou pro stanovení CA, DCA, UDCA, LCA a GCA je HPLC-MS/MS. V praxi je využívána při zjišťování profilů žlučových kyselin u žen trpících v těhotenství intrahepatální cholestasou [31].

Jako léčivo je často využívána kyselina ursodeoxycholová. Pro její stanovení ve farmaceutických přípravcích byla použita i metoda HPLC s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED) [32]. Pro stanovení UDCA a případných nečistot v léčivech byla vytvořena detekční metoda využívající jako mobilní fáze pro HPLC směs metanolu, acetonitrilu a  $0,7 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  octanového pufru, pH 5,0. Kyselina ursodeoxycholová byla stanovována na klasické koloně s oktadecylovou reverzní fází. Elektrochemický detektor byl tvořen kontrolním modulem a analytickou celou, tvořenou in-line pórovitými uhlíkovými elektrodami pracujícími s oxidačními proudy o velikosti +0,6 V a +1,4 V. Bylo potvrzeno, že tato metoda je selektivní a zároveň dostatečně citlivá, pro stanovení UDCA. Výsledky byly porovnány s výsledky získanými UV detektorem při vlnové délce 210 nm. Stanovení pomocí ED byla citlivější [32].

Bez pre-analytických úprav je UV detekce málo citlivá a je tudíž nezbytná derivatizace žlučových kyselin [29]. Např. po převedení kyseliny cholové na její N-nitroso derivát má látka specifickou absorbanci při 285 nm a lze ji stanovit pomocí RP-HPLC s UV detekcí. Kyselinu cholovou lze také stanovit jako N-nitroso-glyko-CA v pufrch o kyselém a neutrálním pH (2 a 7). Při pH 12 se látka rozkládá a odezva se značně snižuje [33].

Další možnou detekcí spojenou s HPLC využitelnou pro stanovení žlučových kyselin je detektor pracující na bázi měření rozptylu světla (evaporative light scattering detector). Kyseliny UDCA, DCA, CA a jejich tauro- a glyko- deriváty jsou stanovitelné po N-acyl amidaci. Jejich separace je možná díky jejich rozdílné lipofilitě a pKa [34, 35].

Kromě HPLC patří mezi zavedené metody stanovení žlučových kyselin také kapilární zónová elektroforéza (CZE). Výhody obou byly spojené v kapilární elektrochromatografii (CEC), která je poměrně novou miniaturizovanou metodou. Novým typem této metody je tlaková kapilární elektrochromatografie (pCEC) [28].

Žlučové kyseliny s 4-nitro-7-piperazino-1,2,3-benzoxadiazolem (za přítomnosti aktivačních činidel jako 2,2'-dipyridyl disulfid či trifenyfosfinem) tvoří fluorescence schopný amid a mohou být detekovány za pomoci detekce laserem indukovanou fluorescencí při excitační vlnové délce 473 nm a emisní vlnové délce 530 nm. V provedeném experimentu bylo užito isokratické eluce pro pCEC. Jako nejvhodnější mobilní fáze byla stanovena směs pufru – N-cyklohexyl-3-aminopropanosulfonové

kyseliny a acetonitrilu. Látky byly stanovovány na koloně, jejíž detekční povrch byl pokryt oktadecyl křemičitanem. Mezi stanovovanými kyselinami byly i CA, DCA, UDCA a LCA. Ta měla nejvyšší afinitu ke stacionární fázi, a proto byla eluována jako poslední [28].

Další vhodná metoda pro stanovení žlučových kyselin je iontová chromatografie využívající aniontové výměny při vysokém pH s pulzní ampérometrickou detekcí (anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection). Standardní roztoky byly tvořeny danou žlučovou kyselinou rozpuštěnou v hydroxidu sodném ( $0,8 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a 8% (v/v) acetonitrilu. Mobilní fáze byla tvořena octanem sodným a acetonitrilem. Žlučové kyseliny byly separovány za izokratických podmínek na koloně s hydrofobním charakterem [36].

### 1.3.2 Elektroanalytické metody a senzory

Vzhledem k tomu, že metody jako HPLC, TLC nebo GC v kombinaci s vhodnou detekční technikou jsou náročné na aparaturu či finančně nebo představují problém využití toxických činidel a rozpouštědel, je snahou zavést méně nákladnou a náročnou elektroanalytickou metodu [37]. Pro žlučové kyseliny existuje poměrně málo poznatků o jejich elektrochemické aktivitě. Dosud známé poznatky týkající se elektrochemie žlučových kyselin a příbuzných steroidních sloučenin jsou shrnuty v přehledném článku [38]. Problémem je, že jak jejich elektrochemická oxidace, tak redukce probíhá v oblasti vysokých kladných nebo záporných potenciálů, a tudíž je omezen výběr vhodných rozpouštědel, základních elektrolytů a elektrodových materiálů [38].

Ferri T. a jeho kolektiv využil ke stanovení žlučových kyselin diferenční pulzní polarografie [39]. Touto metodou byly zkoumány CA, DCA, UDCA a LCA. Všechny žlučové kyseliny byly stanovitelné při  $\text{pH} \geq 4,0$ ; kromě LCA, která je aktivní pouze při vyšším  $\text{pH}$  ( $\geq 10,0$ ). Bylo zjištěno, že pro všechny kyseliny kromě LCA je nejvyšší reprodukovatelnosti a citlivosti dosaženo za následujících podmínek:  $\text{pH}$  5,25 (prostředí octanového, fosfátového, nebo amonného pufru) a iontová síla je  $0,4 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Kyselina lithocholová je stanovitelná při vyšším  $\text{pH}$  [39].

Vhodným elektrodovým materiálem pro důkaz a stanovení žlučových kyselin (CA, DCA, UDCA) elektrochemickou oxidací se zdá být také cyklodextrinem modifikovaná zlatá elektroda. Konkrétně byl studován lipoylamino- $\beta$ - a  $\gamma$ -cyklodextrin navázaný na zlatém disku jako pracovní elektroda [40].

Pro možnost stanovení celkového množství žlučových kyselin v organismu byl zkoumán tenkovrstvý tištěný Ir/C senzor s 3- $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenasou na povrchu, díky které je stanoveno množství enzymaticky vyprodukovaného NADH. Ke vzniku NADH dochází při reakci enzymu s cholátem sodným, kyselinou taurocholovou a kyselinou taurochenodeoxycholovou. Jejich stanovením je možné zjistit celkové množství žlučových kyselin. Pokusná měření na tomto biosenzoru byla prováděna při konstantním potenciálu +0,27 V s hovězím sérem a ve fosfátovém pufru proti argentchloridové elektrodě. Linearita byla vykazována v rozmezí koncentrací 0 až 200 mmol·l<sup>-1</sup> [41].

Pro analýzu BA jako léčiv byla zkoumána možnost stanovení na cholátové iontové selektivní elektrodě s tekutou membránou využívající benzyldimethylcetylamonium cholát jako senzor proti kalomelové referentní elektrodě [37].

Na elektrodě ze skelného uhlíku modifikované a nemodifikované vícevrstevnými uhlíkovými nanotrubičkami (multi-wall carbon nanotubes) byla cyklickou voltametrií (rychlost scanu 0,1 V·s<sup>-1</sup>) studována redukce DCA ve směsném prostředí methanolu a dihydrogen fosforečnanu draselného (1:1). Pík DCA byl pozorovatelný při potenciálu okolo +0,65 V. Na nemodifikované elektrodě tento pík vidět nebyl. Pro pH závislost bylo zjištěno, že píky jsou vyšší v silně kyselém pH oproti pH neutrálnímu nebo zásaditému. Reakce na elektrodě je řízena difúzí [42].

## 1.4 Voltametrické metody

### 1.4.1 Stacionární (Direct current) voltametrie

Potenciál vkládaný na pracovní elektrodu při DCV roste či klesá a s časem se mění lineárně. Metodu lze při konstantním potenciálu považovat za stacionární, je-li rychlost změny potenciálu dostatečně malá ve srovnání s rychlostí ustanovování rovnováhy u elektrody. Elektrodová reakce neprobíhá, pokud u pracovní elektrody v roztoku chybí látka, která by se oxidovala nebo redukovala. Elektroda je zpolarizována a prochází jí kapacitní (nabíjecí) proud. U elektrody se vytváří elektrická dvojvrstva, v jejímž důsledku se elektroda chová jako kondenzátor. K depolarizaci elektrody dochází, dostane-li se k ní látka (depolarizátor), která je při určitém potenciálu oxidovatelná nebo redukovatelná. Elektrodou prochází elektrolytický (faradaický) proud. Mírou koncentrace depolarizátoru je velikost odpovídajícího anodického nebo katodického proudu [43].

### 1.4.2 Cyklická voltametrie

V nemíchaném roztoku je na stacionární elektrodu vkládán opakovaně potenciál trojúhelníkového průběhu rychlostí polarizace  $dE/dt$  a je měřen výsledný proud. Proud píku závisí na rychlosti časové změny potenciálu. Typický tvar píků je důsledkem uspořádání difúzní vrstvy u povrchu pracovní elektrody. Při dostatečně vysoké rychlosti polarizace nestihnou zcela oddifundovat od elektrody produkty elektrodové reakce, díky čemuž je možné je za vhodných podmínek detekovat při opačném směru potenciálové změny [43 – 45].

Význam má CV pro vystižení podstaty elektrodových reakcí, jako je například reverzibilita reakce. Pro tu platí, že potenciál píku je nezávislý na rychlosti změny potenciálu a je o  $28,5/n$  mV negativnější či pozitivnější než půlvlnový potenciál, rozdíl potenciálů anodického a katodického píku má hodnotu  $0,059/n$ , kde  $n$  je počet vyměňovaných elektronů při elektrochemické reakci, a podíl velikosti proudu anodického a katodického píku je roven jedné [43, 46].



Pomocí CV lze určit, zda je děj na pracovní elektrodě řízen difúzí. Pro difúzí řízený děj platí rovnice:  $i = 881 \cdot n^{3/2} \cdot D^{1/2} \cdot A \cdot v^{1/2} \cdot c \cdot \psi$ , kde  $i$  je proud,  $n$  – počet vyměňovaných elektronů při elektrochemické reakci,  $D$  – difúzní koeficient analytu ( $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $A$  – plocha elektrody ( $\text{cm}^2$ ),  $v$  – rychlost změny potenciálu ( $\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $c$  – koncentrace ( $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a  $\psi$  je funkce potenciálu závislá na podmínkách měření takto:

$$\psi = f\left(\frac{1}{r} \left(\frac{D}{n v}\right)^{\frac{1}{2}}\right).$$

Přičemž  $r$  je poloměr elektrody (cm) [47].

### 1.4.3 Diferenční pulzní voltametrie (DPV)

Při této metodě je vkládán napěťový puls o amplitudě 10 až 100 mV po dobu řádově milisekund na potenciál lineárně se měnící s časem. Je zaznamenáván rozdíl proudů změřených těsně před vložením pulsu a na konci pulsu. Závislost rozdílu proudů na potenciálu má tvar píku a prochází maximem, jehož výška může být přímo úměrná koncentraci analytu a využita k jeho kvantifikaci [43, 44]. Pulzní metody mají oproti lineárním metodám vyšší citlivost a zpravidla je dosahováno nižší meze detekce [48]. Je možné je využít ke stopové analýze, protože šum pozadí je do značné míry odstraněn. Nevýhodou DPV je delší čas analýzy [49].

## 1.5 Stacionární elektrody na bázi rtuti

### 1.5.1 Visící rtuťová kapková elektroda

Visící rtuťová kapková elektroda je tvořena obnovitelnou kapkou rtuti na konci kapiláry [51]. V elektroanalytické chemii je HMDE oblíbená pro své vlastnosti jako je velké vodíkové přepětí (dáno materiálem elektrody – rtutí); možnost vyšší rychlosti polarizace pro voltametrický scan oproti klasické rtuťové elektrodě a snadná a rychlá obměna elektrodového povrchu vytvořením nové kapky. Na druhou stranu její velká nevýhoda spočívá v její mechanické nestabilitě a vyskytujících se obavách ohledně

toxicity rtuti, díky nimž je v některých zemích její používání zakázané [47, 50 – 52]. Rozsah potenciálů, při kterých je HMDE použitelná, je asi od +0,4 V do –2,0 V, v závislosti na pH a složení prostředí a základním elektrolytu [53]. Na rtuťových elektrodách lze zpravidla stanovit látky elektroaktivní v rámci jejich potenciálového okna na základě jejich elektrochemické redukce, látky reagující s ionty rtuti, případně na rtuti adsorbovatelné [50].

### **1.5.2 Rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgámová elektroda**

Kompromisem mezi rtuťovou elektrodou a pevnými elektrodami jsou elektrody na bázi rtuťových amalgámů, které kombinují výhody obou typů elektrod [54 – 57]. Pro elektrochemické účely byla znovuobjevena v roce 2000. V případě m-AgSAE se jedná o pevnou elektrodu, jejíž povrch je modifikován rtuťovým meniskem, který je kapalný a úplně hladký [52]. Pokrytí meniskem je stabilní a hodnoty pH prostředí neovlivňují jeho rozklad uvnitř okna pracovního potenciálu. Výsledky (proud píku a potenciál píku v maximu výšky píku) naměřené na m-AgSAE jsou často srovnatelné s výsledky obdrženyými měřeními na HMDE, avšak s nižší citlivostí, pro organické i anorganické analyty. Velikost vodíkového přepětí je pro m-AgSAE srovnatelná s HMDE [53, 58]. Využití amalgámových elektrod v organické analýze bylo shrnuto v několika přehledných referátech [59 – 61].

## **2. Experimentální část**

### **2.1 Studované látky**

Bylo studováno elektrochemické chování pěti žlučových kyselin: kyseliny cholové, glykocholové, deoxycholové, ursodeoxycholové a lithocholové. Standardy žlučových kyselin byly od firmy Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA) s minimální koncentrací 97 %.

### **2.2 Použité chemikálie**

Kromě žlučových kyselin byly použity následující chemikálie: Deionizovaná voda (Milli-Qplus system, Millipore, USA); methanol (Merck, Drážďany, Německo;  $\geq 99,9\%$  a Penta, Chrudim, ČR;  $\geq 99,8\%$ ); methanol pro HPLC (Acros Organics, Belgie; čistota p.a.); acetonitril pro HPLC (Merck, Německo; p.a.); tetrahydrofuran (Sigma-Aldrich, USA;  $\geq 99,9\%$ ); hydroxid sodný (Penta, ČR; p.a.), kyselina fosforečná (Lachema, Brno, ČR; p.a.), kyselina octová (Lachema, ČR; 98%); kyselina boritá (Penta, ČR; p.a.); tetraboritan disodný dekahydrát (Lachema, ČR; p.a.); kyselina boritá (Penta, ČR; p.a.); chlorid draselný (Lach-Ner, Neratovice, ČR; p.a.); chlorid hexaammin-ruthenitý –  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$  (Aldrich, Německo; 98 %.)

### **2.3 Příprava roztoků**

#### **2.3.1 Zásobní roztoky žlučových kyselin**

Rozpuštěním přesně odváženého množství příslušné žlučové kyselin na analytických vahách (Sartorius, Německo, typ 2004 MP) byly připraveny zásobní roztoky žlučových kyselin o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v methanolu či tetrahydrofuranu.

### 2.3.2 Pufry

Při měření byly používány následující pufry: Brittonův – Robinsonův (BR) pufr, borátový pufr a octanový pufr. Na požadovaný objem byly všechny pufry doplňovány deionizovanou vodou a pH pufrů bylo měřeno pH-metrem Jenway 4330 (Jenway, Staffordshire, UK).

Kyselá složka BR pufru byla připravena z kyseliny fosforečné, kyseliny octové a kyseliny borité. Výsledná koncentrace všech složek byla  $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Zásaditá složka byla tvořena hydroxidem sodným o koncentraci  $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Borátový pufr ( $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , pH 9,0) byl připraven z kyseliny borité a tetraboritanu disodného dekahydrátu.

Octanový pufr ( $0,07 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , pH 5,0) byl připraven z kyseliny octové a hydroxidu sodného (použita zásaditá složka BR pufru).

## 2.4 Metody měření a přístroje

### 2.4.1 Voltametrická měření

Voltametrická měření byla prováděna v tříelektrodovém zapojení. Pracovní elektrody byly: rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgámová elektroda s průměrem menisku 0,5 mm (výrobní číslo – 2-05-52; Eco-Trend Plus, Praha, ČR), nebo visící rtuťová kapková elektroda (typ UM $\mu$ E, výrobní číslo 06-2010-05, Eco-Trend Plus, ČR). Jako referentní a pomocná elektroda byly použity argentchloridová elektroda s chloridem draselným o koncentraci  $3,0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (EPP CZ R 00406) a platinová drátková elektroda (ETP CZ P 00506), obě od výrobce Elektrochemické detektory, Turnov, ČR.

Na začátku každého dne měření na m-AgSAE byla provedena aktivace povrchu elektrody v roztoku chloridu draselného ( $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) po dobu 300 s při vloženém potenciálu  $-2200 \text{ mV}$ . Meniskus na elektrodě byl vytvářen ponořením do kapalné rtuti asi na 15 s. Nový meniskus byl vytvářen vždy po dlouhodobém přerušení práce a při jeho ztrátě. Před aktivací a vytvořením nového menisku byla elektroda vyleštěna na vlhké alumině o velikosti částic  $1,1 \mu\text{m}$  po dobu asi jedné minuty.

Všechna voltametrická měření byla provedena na voltametrickém analyzátoru EcoTribo Polarograf ovládaném osobním počítačem za využití softwaru Polar Pro 5.1 (EcoTrend-Plus, Praha, ČR). Software pracoval v operačním systému Microsoft Windows XP.

Není-li uvedeno jinak, měřené roztoky byly připravovány do 10ml odměrných baněk. Základní elektrolyt tvořil pufr (ve většině případů BR pufr) a methanol v poměru 9:1. Měřená koncentrace žlučových kyselin byla  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Měřené roztoky byly před začátkem měření asi pět minut probublávány dusíkem (Linde, Praha, čistota 4.0), aby došlo k odstranění kyslíku z roztoku. Po dobu měření byl dusík přiváděn nad roztok. Promývačka byla naplněna deionizovanou vodou a organickým rozpouštědlem ve stejném poměru, jako v měřeném roztoku.

Elektrochemická redukce žlučových kyselin byla prováděna metodami DPV, DCV a CV. Rychlost polarizace pro DPV činila  $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ , pro DCV  $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ ; pro metodu CV byly využívány různé rychlosti dle potřeby v rozmezí od  $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  po  $2560 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ . Puls vkládaný na potenciál v metodě DPV měl výšku  $-50 \text{ mV}$  a šířku  $80 \text{ ms}$ . Po porovnání výsledků měření s vkládanými regeneračními pulsy a bez regeneračních pulsů před každým scanem bylo shledáno, že vložení regeneračních pulsů na měření nemá vliv. Měření tedy probíhala bez vkládání regeneračních pulsů.

#### **2.4.2 Potenciostatická coulometrie**

Coulometrická měření byla prováděna stejně jako voltametrická v tříelektrodovém zapojení se stejnou pomocnou a referenční elektrodou. Pracovní elektrodou bylo rtuťové dno ve voltametrické nádobce. Roztok byl po dobu měření míchán a dusík byl přiváděn nad povrch elektrolyzovaného roztoku.

Nejprve byl elektrolyzován samotný BR pufr (pH 5,0) po dobu třiceti minut. Dále směs elektrolyzovaného BR pufru (pH 5,0) a methanolu v poměru 9:1 také po dobu třiceti minut. Tento roztok byl základním elektrolytem. Následně byl elektrolyzován roztok elektrolyzovaného BR pufru (pH 5,0) a GCA v methanolu, jejíž výsledná koncentrace v roztoku byla  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a poměr BR pufr methanol byl 9:1. Tento roztok byl elektrolyzován po dobu dvou hodin, kdy byly odebírány vzorky v čase

pro zjištění, zda dochází k rozkladu látky. Na pracovní elektrodu byl vkládán konstantní potenciál: pro BR pufr  $-1400$  mV, pro základní elektrolyt a roztok GCA  $-1500$  mV. Z Faradayova zákona bylo vypočteno celkové množství prošlého náboje, počet vyměňovaných elektronů a množství vznikajícího vodíku.

#### **2.4.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi s UV detekcí**

Měření technikou HPLC byla provedena na kapalinovém chromatografu (systém Merck-Hitachi LaChrom, Německo), který se skládal z gradientové pumpy L-7100, autosampleru L-7200, spektrofotometrického detektoru L-7400 a řídicí jednotky D-7000. Separace probíhala na koloně LiChroCART® 125 – 4 (RP – 18,  $5\mu\text{m}$ , Merck, Německo). Řízení HPLC systému, sběr dat a jejich vyhodnocení bylo zajištěno osobním počítačem s programem HSM (Merck-Hitachi, Německo). Software pracoval v operačním systému MS Windows NT. Měření byla prováděna za laboratorní teploty a kolona nebyla termostatována.

Kyselina glykocholová byla identifikována UV detektorem při vlnové délce  $210$  nm. Množství dávkovaného vzorku činilo  $20\ \mu\text{l}$  a průtoková rychlost mobilní fáze činila  $0,9\ \text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Tlak na koloně se držel v rozmezí od  $60$  do  $65$  barr.

Mobilní fázi tvořil methanol, acetonitril a octanový pufr ( $0,07\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , pH  $5,0$ ) v poměru  $55 : 20 : 25$  (v/v/v).

Kalibrační roztoky kyseliny glykocholové byly připraveny v rozmezí koncentrací  $1\cdot 10^{-6}$  až  $1\cdot 10^{-3}\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  v BR pufru.

#### **2.5 Zpracování dat**

Voltametrickými metodami naměřené křivky byly vyhodnocovány v programu Polar Pro 5.1. Velikosti píku byly zjištěny prodloužením základní linie před nástupem píku a následným odečtením proudu v proudovém maximu píku a proudu od prodloužení základní linie při potenciálu odpovídajícím potenciálu píku.

Výsledky byly zpracovávány pomocí programů OriginPro 8 (OriginLab Corporation, USA), Excel 2007 (Microsoft, USA) a Word 2007 (Microsoft, USA).

Voltametrická měření byla prováděna minimálně pětkrát, měření metodou HPLC třikrát. V práci jsou uváděny mediány naměřených hodnot. Směrodatné odchylky byly vypočteny pomocí programu Excel 2007. Hodnoty LOD získané metodou DPV byly vypočteny jako trojnásobek a hodnoty LOQ jako desetinásobek směrodatné odchylky velikosti proudu píku v maximu výšky pro nejnižší naměřenou koncentraci vydělené směrnici příslušné lineární závislosti. Pro RP-HPLC pak jako koncentrace odpovídající trojnásobku či desetinásobku šumu.

### 3. Výsledky a diskuze

#### 3.1 Rtuťovým meniskem modifikovaná tuhá stříbrná amalgámová elektroda

##### 3.1.1 pH závislost

Bylo studováno chování žlučových kyselin (o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) v závislosti na různých hodnotách pH v rozsahu od pH 3,0 do pH 12,0. Prostředí o rozdílných hodnotách pH bylo zajištěno BR pufrů. Základní elektrolyt tvořil BR pufr a methanol v poměru 9:1.

V tabulce 3.1 jsou zaznamenány rozpustnosti studovaných žlučových kyselin ve výše zmíněných základních elektrolytech. Jak bylo zmíněno v úvodu (tab. 1.1),  $pK_a$  žlučových kyselin se pohybuje v rozmezí hodnot okolo 4,0 až 6,0, což znamená, že při pH hodnotách větších než je hodnota  $pK_a$  dochází k disociaci karboxylové skupiny žlučových kyselin za tvorby příslušného aniontu, a tudíž je předpokladem, že se kyseliny budou v neutrálních a bazických pH snadněji rozpouštět. Ze studovaných kyselin má nejnižší hodnotu  $pK_a$  (3,8) kyselina glykocholová, která je konjugátem CA s glycinem a nejvyšší hodnotu kyselina deoxycholová (6,8).

Rozpustnost žlučových kyselin je ovlivněna i jejich polaritou. Nejpolárnější ze studovaných žlučových kyselin byly CA a GCA, které mají v molekule vázané tři hydroxylové skupiny na steroidním skeletu. Díky zmíněným vlastnostem byly CA a GCA rozpustné v celém rozsahu pH. Kyseliny DCA a UDCA mají vázané dvě hydroxylové skupiny a byly rozpustné až od pH 6,0, kdy se nacházejí v disociované formě. Nejméně rozpustná od pH 10,0 byla LCA, což odpovídá jedné vázané hydroxylové skupině.



Voltametrické chování žlučových kyselin v závislosti na pH bylo zkoumáno metodami DPV a DCV. Voltamogramy naměřené metodou DPV jsou zobrazeny v obrázku 3.1. Srovnáním dat získaných při měření pH bylo zjištěno, že metoda DCV je oproti DPV méně citlivá a poskytuje hůře vyhodnotitelné signály. Proto byla další měření prováděna již jen metodou DPV.

V tabulce 3.2 jsou zaznamenány hodnoty potenciálu a proudu, které odpovídají maximu píku příslušné žlučové kyseliny v závislosti na pH. Grafickou podobu obou závislostí představuje obr. 3.2. Pro kyseliny CA, DCA, UDCA a LCA se hodnota potenciálu v maximu píku pohybovala okolo  $-1400$  mV. Pro GCA, která je jediná konjugátem s glycinem, okolo  $-1500$  mV. Z hodnoty proudu odpovídající maximu píku v závislosti na pH je patrné, že CA poskytuje nejvyšší píky od pH 3,0 do pH 6,0; GCA do pH 7,0 (v tomto rozmezí pH jsou kyseliny rozpuštěné, viz tab. 3.1); DCA a UDCA do pH 5,0 (kyseliny nerozpuštěné); naopak LCA lze detekovat až od pH 7,0, ale až od pH 10,0, kdy je LCA rozpuštěná, poskytuje výraznější signál, který je na úrovni proudové odezvy ostatních žlučových kyselin v zásaditých prostředích. Obecně platí, že v zásaditém prostředí jsou proudové odezvy píků pro všechny studované kyseliny výrazně nižší, než v prostředí kyselém (viz obr. 3.2). Kvůli špatným výsledkům (nízké píky, velký šum, měřitelnost až od pH 7,0) poskytovaným při měření LCA na m-AgSAE byla další měření prováděna jen s kyselinami: CA, GCA, DCA a UDCA.

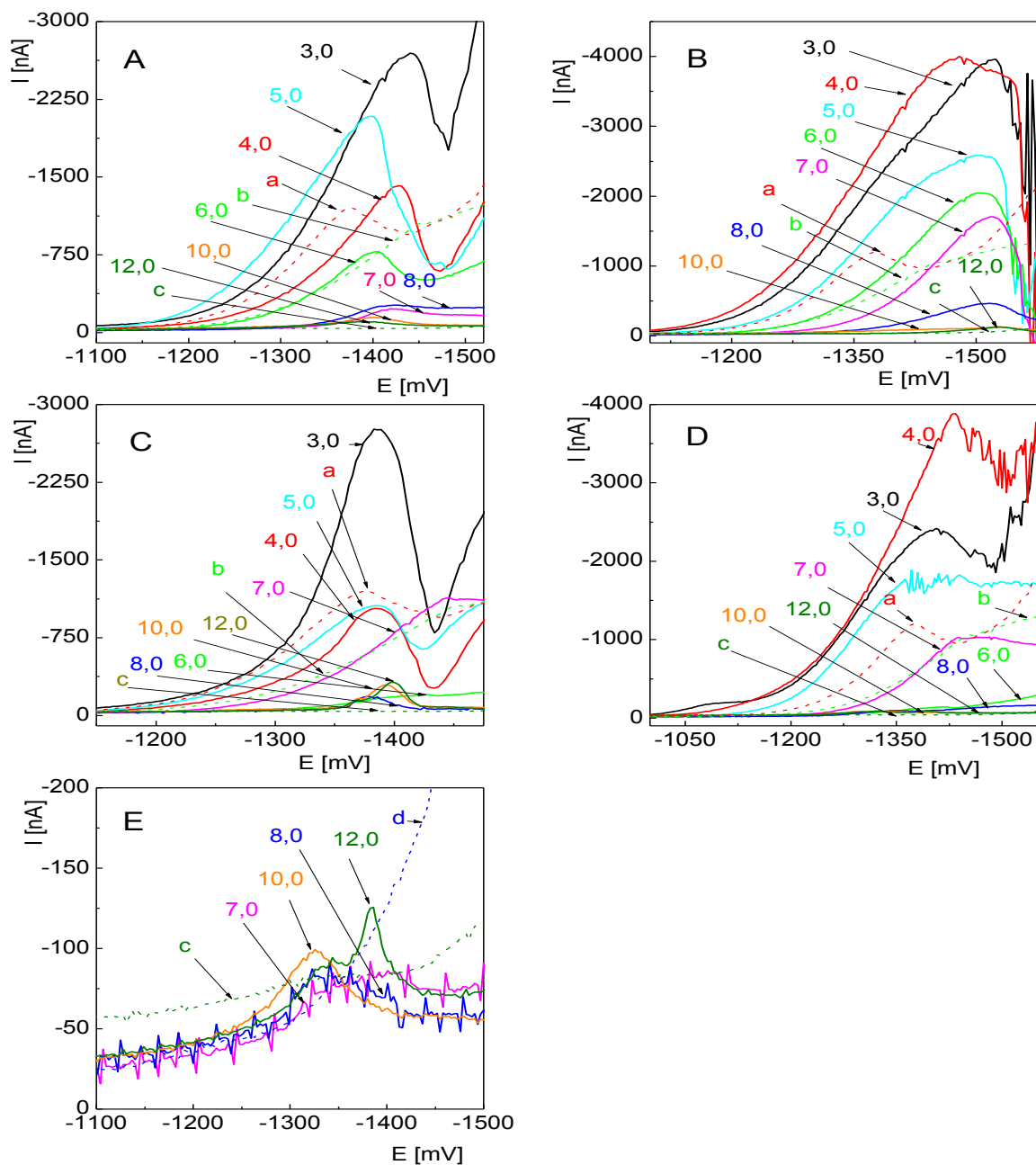
Žlučové kyseliny DCA a UDCA byly již zkoumány metodou DPV na HMDE v bakalářské práci [62], kdy měření také probíhala v prostředí BR pufru a methanolu (9:1) oproti argentchloridové elektrodě s chloridem draselným o koncentraci  $3,0 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . V souladu s předkládanou prací byly na HMDE pro obě kyseliny měřitelné vyšší hodnoty proudu píku v kyselém pH. Také na HMDE byly píky měřeny pro DCA kolem  $-1300$  mV a pro UDCA kolem  $-1200$  mV v pH 8,0 – 12,0. Se snižujícím se pH docházelo k posunu do zápornější oblasti asi o  $-100$  mV.

Redukce CA, DCA, UDCA a LCA pomocí diferenční pulzní polarografie na DME byla prováděna v prostředí octanového, fosfátového, nebo amonného pufru s iontovou silou  $0,4 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  oproti argentchloridové elektrodě [36]. V této studii byly

kromě LCA kyseliny stanovitelné od pH 4,0 a stejně jako na m-AgSAE byla LCA stanovitelná až od pH 10,0. Píky byly registrovány při potenciálu  $-1150$  až  $-1350$  mV, zatímco na m-AgSAE byly píky těchto žlučových kyselin registrovány při potenciálu  $-1300$  až  $-1450$  mV.

**Tab. 3.1:** Rozpustnosti kyseliny cholové (CA), glykocholové (GCA), deoxycholové (DCA), ursodeoxycholové (UDCA) a lithocholové (LCA) o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v prostředí Brittonova – Robinsonova (BR) pufru a methanolu (9:1) pro pH pufru 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 10,0 a 12,0. ANO – kyselina byla rozpuštěná. NE – kyselina nebyla rozpuštěná.

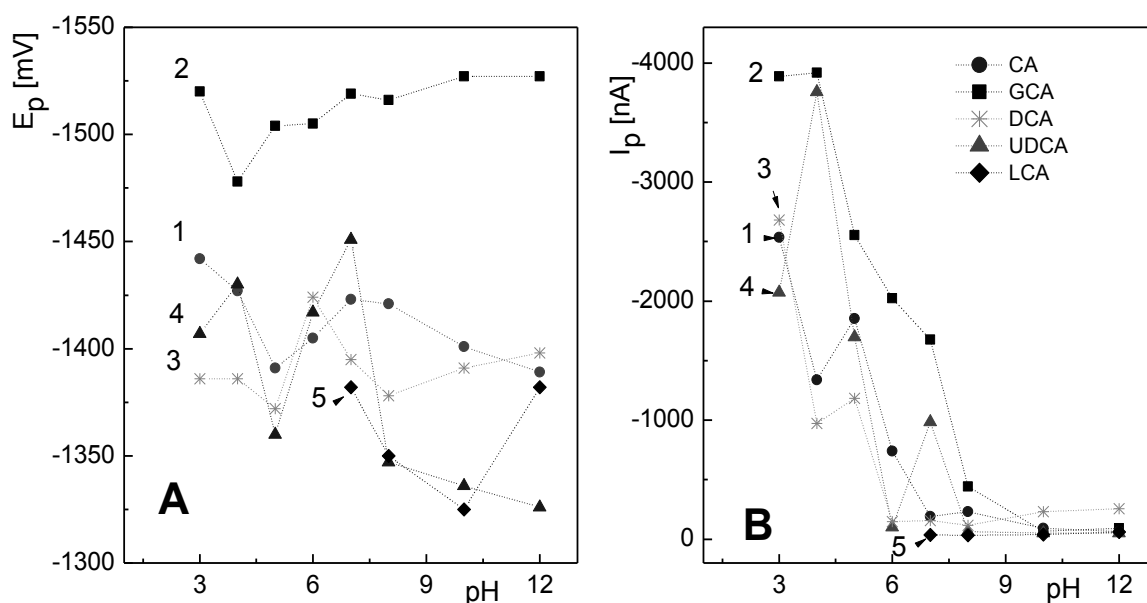
<b>pH</b> BR pufru	<b>CA</b> rozpustnost	<b>GCA</b> rozpustnost	<b>DCA</b> rozpustnost	<b>UDCA</b> rozpustnost	<b>LCA</b> rozpustnost
3,0	ANO	ANO	NE	NE	NE
4,0	ANO	ANO	NE	NE	NE
5,0	ANO	ANO	NE	NE	NE
6,0	ANO	ANO	ANO	ANO	NE
7,0	ANO	ANO	ANO	ANO	NE
8,0	ANO	ANO	ANO	ANO	NE
10,0	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO
12,0	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO



**Obr. 3.1:** DP voltamogramy na m-AgSAE kyseliny cholové (A), glykocholové (B), deoxycholové (C), ursodeoxycholové (D) a lithocholové (E) o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v prostředí Brittonova – Robinsonova (BR) pufru a methanolu (9:1). Čísla v grafu odpovídají hodnotě pH BR pufru. Základní elektrolyt (přerušovaně) – pH BR pufru: a) 4,0; b) 6,0; c) 12,0; d) 7,0.

**Tab. 3.2:** Hodnoty potenciálu ( $E_p$ ) a proudu ( $I_p$ ) odpovídající maximu píku žlučových kyselin (BA): kyseliny cholové (CA), glykocholové (GCA), deoxycholové (DCA), ursodeoxycholové (UDCA) a lithocholové (LCA) o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v prostředí Brittonova - Robinsonova pufru a methanolu (9:1) pro pH pufru 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 10,0 a 12,0 naměřené metodou DPV na m-AgSAE.

pH BR pufru	BA	$E_p$ (mV)	$I_p$ (nA)	BA	$E_p$ (mV)	$I_p$ (nA)	BA	$E_p$ (mV)	$I_p$ (nA)
3,0	CA	-1442	-2534	GCA	-1520	-3886	DCA	-1386	-2681
4,0		-1427	-1339		-1478	-3919		-1386	-973
5,0		-1391	-1854		-1504	-2553		-1372	-1184
6,0		-1405	-741		-1505	-2024		-1424	-147
7,0		-1423	-190		-1519	-1675		-1395	-881
8,0		-1421	-230		-1516	-442		-1378	-116
10,0		-1401	-91		-1527	-67		-1391	-232
12,0		-1389	-64		-1527	-91		-1398	-256
3,0	UDCA	-1407	-2073	LCA	x	x			
4,0		-1430	-3758		x	x			
5,0		-1360	-1697		x	x			
6,0		-1417	-102		x	x			
7,0		-1451	-986		-1382	-37			
8,0		-1347	-64		-1350	-33			
10,0		-1336	-52		-1325	-40			
12,0		-1326	-52		-1382	-62			



**Obr. 3.2:** (A) Graf závislosti potenciálu píku  $E_p$  a (B) výšky píku  $I_p$  na pH. Hodnoty naměřené metodou DPV na m-AgSAE pro kyselinu cholovou (CA) – 1, glykocholovou (GCA) – 2, deoxycholovou (DCA) – 3, ursodeoxycholovou (UDCA) – 4 a lithocholovou (LCA) – 5 o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v prostředí Brittonova - Robinsonova pufru a methanolu (9:1).

Při měření bylo pozorováno, že s rostoucím pH dochází v přítomnosti žlučových kyselin k posunu potenciálu úniku základního elektrolytu na katodické straně k zápornějším hodnotám potenciálu, tento posun je ovšem nekonzistentní s potenciálem úniku samotného základního elektrolytu. Jev je dobře patrný např. pro kyselinu choleovou na obr. 3.1 (A).

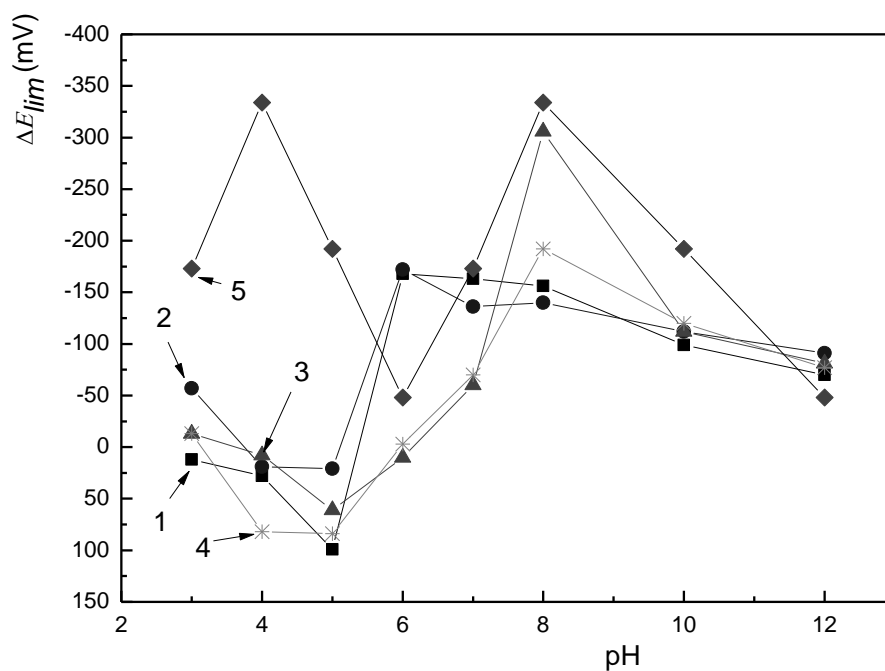
V tabulce 3.3 jsou pozorované závislosti hodnot limitního potenciálu ( $E_{\text{lim}}$ ) pro katodický únik základního elektrolytu (BR pufr o hodnotě pH 3,0 až 12,0 a methanol, 9:1) v nepřítomnosti a přítomnosti příslušné žlučové kyseliny ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a hodnoty katodického proudu, při kterých byly odečteny. Na obr. 3.3 je znázorněn rozdíl těchto limitních potenciálů  $\Delta E_{\text{lim}}$  v závislosti na pH BR pufru pro jednotlivé žlučové kyseliny. V roztocích majících kyselé pH dochází ke katodickému úniku základního elektrolytu v přítomnosti žlučové kyseliny při mírně kladnějším potenciálu (rozdíl do 100 mV), než leží katodický únik základního elektrolytu. V roztocích s pH od 5,0 až 6,0 a vyšším je tomu naopak a rozdíly úniku v přítomnosti a nepřítomnosti kyseliny jsou vyšší (rozdíl do -300 mV). Změna se tedy nachází přibližně v oblasti pH odpovídající pKa žlučových kyselin. Výjimkou je LCA, u které docházelo ve všech pH ke katodickému úniku elektrolytu se žlučovou kyselinou po katodickém úniku základního elektrolytu. Tato kyselina je ze všech studovaných kyselin nejhůře rozpustná (je nerozpustná do pH 8,0, viz tab. 3.1)

Katodický únik základního elektrolytu je způsoben vývojem vodíku na elektrodě ( $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$ ). Ovlivnění úniku základního elektrolytu tedy zřejmě souvisí s výskytem nedisociované (v kyselém prostředí) a disociované (neutrální a bazické prostředí) formy žlučových kyselin v roztoku, jejich rozpustností a použitou měřicí technikou (viz odlišné výsledky pro kyselé prostředí pro cyklickou voltametrii na m-AgSAE, kapitola 3.1.2, a studium GCA na HMDE, kapitola 3.2.1). V zásaditém prostředí s menší dostupností protonů a disociovanou formou kyseliny vede její adsorpce zřejmě k inhibici vývoje vodíku na elektrodovém povrchu, tj. k posunu úniku základního elektrolytu k zápornějším potenciálům. V kyselé oblasti, kde je dostatek protonů, nejsou rozdíly v potenciálech úniku v přítomnosti a nepřítomnosti žlučové kyseliny tak výrazné. I zde však dochází pravděpodobně k adsorpci nedisociované formy na povrch elektrody a případný kladný posun potenciálů úniku by mohl být způsoben katalýzou reakce vývinu vodíku díky přítomnosti nedisociované karboxylové

skupiny příslušné kyseliny. Únik základního elektrolytu je ovlivněn i malým množstvím rozpuštěné kyseliny, jak lze usoudit ze shodných trendů pro kyseliny s rozdílnou rozpustností v různých prostředích pH (viz tab. 3.1).

**Tab. 3.3:** Hodnoty limitního potenciálu ( $E_{\text{lim}}$ ) pro katodický únik elektrolytu pro základní elektrolyt v nepřítomnosti ( $E_{\text{lim, ZE}}$ ) a přítomnosti žlučové kyseliny ( $E_{\text{lim, BA}}$ ) o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (kyseliny: CA – choleová; GCA – glykocholová; DCA – deoxycholová; UDCA – ursodeoxycholová; LCA – lithocholová) odečtené při hodnotě katodického proudu  $I_k$  a jejich rozdílu  $\Delta E_{\text{lim}}$  ( $E_{\text{lim, BA}} - E_{\text{lim, ZE}}$ ). Hodnoty naměřené metodou DPV na m-AgSAE v prostředí Brittonova – Robinsonova pufru a methanolu (9:1) o pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 10,0 a 12,0.

pH BR pufru	BA	$I_k$ (nA)	$E_{\text{lim, ZE}}$ (mV)	$E_{\text{lim, BA}}$ (mV)	$\Delta E_{\text{lim}}$ (mV)	BA	$I_k$ (nA)	$E_{\text{lim, ZE}}$ (mV)	$E_{\text{lim, BA}}$ (mV)	$\Delta E_{\text{lim}}$ (mV)
3,0	CA	-3500	-1550	-1538	12	GCA	-3500	-1550	-1607	-57
4,0		-3000	-1618	-1590	28		-3000	-1618	-1599	19
5,0		-1500	-1642	-1543	99		-1500	-1641	-1621	21
6,0		-1000	-1440	-1608	-168		-1000	-1439	-1611	-172
7,0		-250	-1490	-1653	-163		-250	-1490	-1626	-136
8,0		-250	-1477	-1633	-156		-250	-1477	-1617	-140
10,0		-150	-1583	-1682	-99		-150	-1583	-1695	-112
12,0		-100	-1608	-1678	-70		-100	-1560	-1651	-91
3,0	DCA	-3500	-1550	-1563	-13	UDCA	-3500	-1550	-1563	-13
4,0		-3000	-1618	-1610	8		-3000	-1618	-1536	82
5,0		-1750	-1652	-1591	61		-1750	-1652	-1568	84
6,0		-800	-1696	-1686	10		-800	-1696	-1699	-3
7,0		-800	-1603	-1663	-60		-800	-1601	-1671	-70
8,0		-250	-1476	-1782	-306		-250	-1476	-1668	-192
10,0		-250	-1640	-1752	-112		-250	-1640	-1760	-120
12,0		-250	-1714	-1795	-81		-250	-1714	-1791	-77
3,0	LCA	-250	-1492	-1665	-173					
4,0		-250	-1477	-1811	-334					
5,0		-150	-1583	-1775	-192					
6,0		-150	-1665	-1713	-48					
7,0		-250	-1492	-1665	-173					
8,0		-250	-1477	-1811	-334					
10,0		-150	-1583	-1775	-192					
12,0		-150	-1665	-1713	-48					



**Obr. 3.3:** Závislost rozdílu potenciálů  $\Delta E_{lim}$  úniku elektrolytu v přítomnosti a nepřítomnosti žlučové kyseliny a základního elektrolytu na pH. Hodnoty naměřené metodou DPV na m-AgSAE v prostředí Brittonova – Robinsonova pufru a methanolu (9:1) pro žlučové kyseliny o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Rozdíl potenciálů úniku elektrolytu kyseliny 1 – cholové (CA, ■), 2 – glykocholové (GCA, ●), 3 – deoxycholové (DCA, ▲), 4 – ursodeoxycholové (UDCA, \*) a lithocholové (LCA, ◆) a základního elektrolytu.

### 3.1.2 Studium povahy elektrochemických dějů pomocí cyklické voltametrie

Roztoky kyselin CA, GCA, DCA a UDCA o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v BR pufru (pH 4,0) a methanolu (9:1) byly měřeny metodou CV s rychlostmi scanu od  $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  do  $2560 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ . V tomto prostředí poskytly studované látky nejvýraznější signály pro metodu DPV, viz předchozí kapitola, a dále bylo toto prostředí použito pro studium elektrochemické redukce na m-AgSAE a HMDE pro kyselinu chenodeoxycholovou již v jiné práci [63]. Cyklické voltamogramy jsou na obr. 3.4.

Obecně lze říci, že se zvyšující se rychlostí scanu docházelo ke zvyšování měřeného proudu píku. Ve všech případech směřoval pík zaznamenaný při katodickém scanu do katodické oblasti, ale pík zaznamenaný při anodickém scanu směřoval klasicky do anodické oblasti či netradičně do katodické oblasti proudů (podrobněji viz dále). Oblast potenciálů, ve které byly píky pozorovatelné, měla rozsah  $-1200 \text{ mV}$  až  $-1650 \text{ mV}$  v závislosti na měřené látce. Píky byly vždy pozorovatelné v blízkosti úniku základního elektrolytu. Hodnoty potenciálu v maximu výšky píku pro katodický pík ( $E_{p,k}$ ), pro anodický pík ( $E_{p,a}$ ) a jejich rozdíl ( $\Delta E_p$ ) jsou zaznamenány v tab. 3.4 (viz strana 43). Hodnoty proudu výšky píku pro katodický pík ( $I_{p,k}$ ), pro anodický pík ( $I_{p,a}$ ) a jejich podíl ( $I_{p,k} / I_{p,a}$ ) jsou zaznamenány v tab. 3.5.

Pro všechny zkoumané kyseliny kromě UDCA je katodický pík pozorovatelný a měřitelný již od rychlosti  $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ , pro UDCA až od  $160 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ . DCA vykazuje od rychlosti  $320 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  vznik katodického dvojpíku (viz obr. 3.4 C; v tab. 3.5 jsou zaznamenány hodnoty pro první pík).

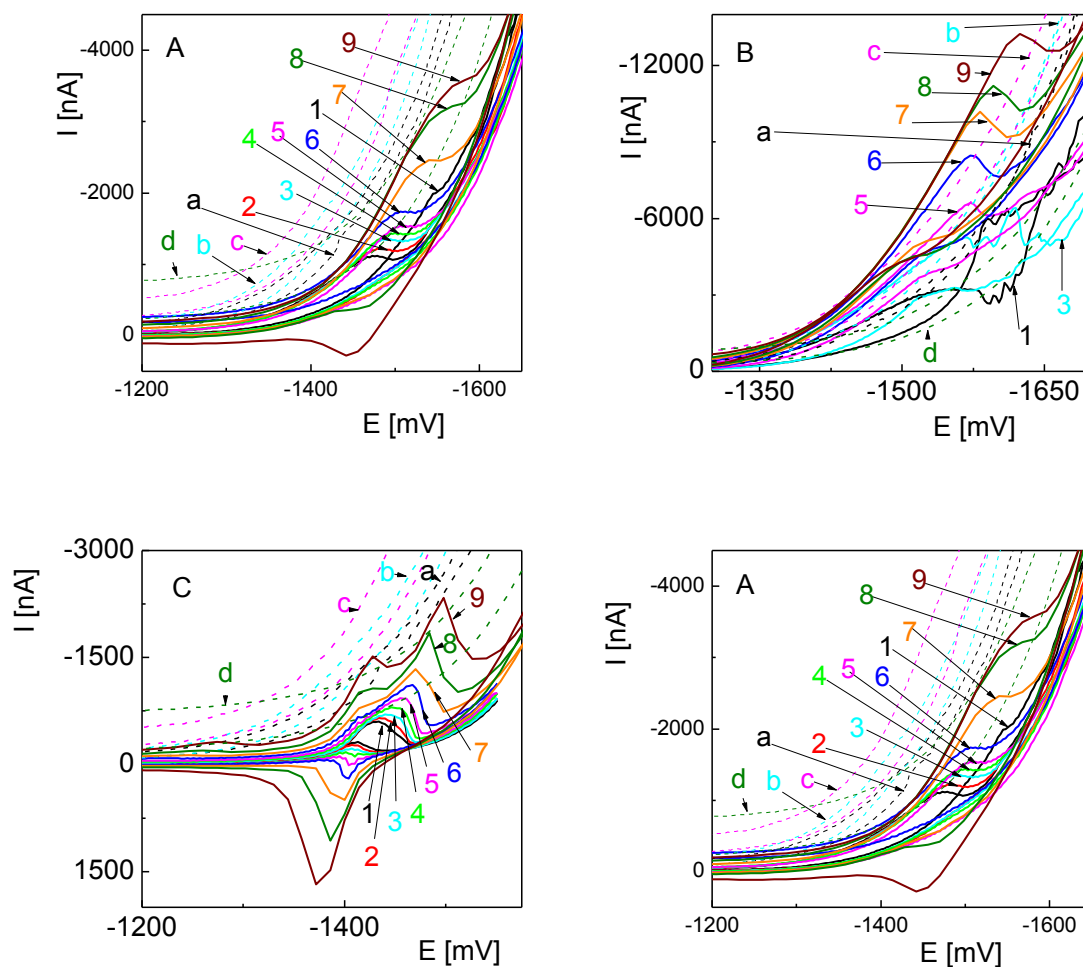
Pro UDCA a CA byl anodický pík pozorovatelný až při vyšších rychlostech ( $640 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  a  $1280 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ ) a jeho vrchol směřoval klasicky do anodické oblasti. Anodický pík GCA byl pozorovatelný od  $40 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  a jeho vrchol byl obrácen netypicky do katodické oblasti. Pro DCA byl anodický pík měřitelný již od rychlosti polarizace  $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ , kdy do rychlosti  $40 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  směřoval vrchol píku do katodické oblasti a od rychlosti polarizace  $80 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  do anodické oblasti. Podobné chování bylo popsáno na m-AgSAE pro kyselinu chenodeoxycholovou v témže prostředí [63]. DCA dále vykazuje vznik katodického dvojpíku od rychlosti  $320 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  (viz výše).

Uvedené jevy – vznik katodického dvojpíku, anodický pík obrácený do katodické oblasti – byly popsány pro elektrochemické reakce probíhající



v adsorbovaném stavu. Konkrétně, ke vzniku dvojpíku díky následnému píku („post-peak“) může docházet v případě, že je produkt elektrodové reakce silně adsorbován na povrch elektrody [64]. Výskyt dvojpíku u DCA za použití metody CV byl pozorován také při měření na HMDE v prostředí BR pufru (pH 12,0) a methanolu (9:1) [62]. Ve stejném prostředí byl při nižších rychlostech polarizace do 320 mV/s dvojpík zaznamenán i pro UDCA [62]. Také anodický pík směřující vrcholem do katodické oblasti byl popsán pro elektrochemické reakce probíhající v adsorbovaném stavu [65], stejně jako nízké hodnoty  $\Delta E_p$ , blížíící se pro reverzibilní děj nule [63]. Z hodnot  $\Delta E_p$  a  $I_{p,k} / I_{p,a}$  byl děj pro studované žlučové kyseliny určen jako quasireversibilní.

Z naměřených hodnot je dobře patrné, že se zvyšující se rychlostí polarizace dochází k posunu katodických píků k zápornějším hodnotám katodické oblasti. Naopak anodický pík se posouvá se zvyšující se rychlostí polarizace ke kladnějším hodnotám katodické oblasti.



**Obr. 3.4:** Cyklické voltamogramy na m-AgSAE pro kyselinu (A) cholovou, (B) glykocholovou, (C) deoxycholovou a (D) ursodeoxycholovou o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v prostředí Brittonova – Robinsonova pufru o pH 4,0 a methanolu (9:1). Rychlosti scanu žlučových kyselin: 1)  $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ ; 2)  $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ ; 3)  $40 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ ; 4)  $80 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ ; 5)  $160 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ ; 6)  $320 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ ; 7)  $640 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ ; 8)  $1280 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ ; 9)  $2560 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ . Rychlosti scanu základního elektrolytu (přerušovaná čára): a)  $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ ; b)  $40 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ ; c)  $160 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ ; d)  $1280 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ .

**Tab. 3.4:** Hodnoty potenciálu v maximu výšky píku pro katodický pík ( $E_{p,k}$ ), pro anodický pík ( $E_{p,a}$ ) a jejich rozdíl ( $\Delta E_p$ ) pro žlučové kyseliny o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (kyseliny: CA – cholová; GCA – glykocholová; DCA – deoxycholová; UDCA – ursodeoxycholová). Hodnoty naměřené metodou CV na m-AgSAE v prostředí Brittonova – Robinsonova pufru a methanolu (9:1) o pH 4,0 při různých rychlostech scanu ( $\nu$ ).

$\nu$ ( $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ )	BA	$E_{p,k}$ (mV)	$E_{p,a}$ (mV)	$\Delta E_p$ (mV)	BA	$E_{p,k}$ (mV)	$E_{p,a}$ (mV)	$\Delta E_p$ (mV)
10		-1478	x	x		-1562	x	x
20		-1486	x	x		-1570	x	x
40		-1491	x	x		-1572	-1558 <sup>a</sup>	-14
80		-1502	x	x		-1575	-1551 <sup>a</sup>	-24
160	<b>CA</b>	-1507	x	x	<b>GCA</b>	-1578	-1536 <sup>a</sup>	-42
320		-1519	x	x		-1580	-1523 <sup>a</sup>	-57
640		-1540	x	x		-1587	-1511 <sup>a</sup>	-76
1280		-1558	-1472	-86		-1613	-1497 <sup>a</sup>	-116
2560		-1580	-1458	-122		-1621	-1467 <sup>a</sup>	-154
10		-1434	-1414 <sup>a</sup>	-20		x	x	x
20		-1438	-1410 <sup>a</sup>	-28		x	x	x
40		-1443	-1407 <sup>a</sup>	-36		x	x	x
80		-1450	-1426	-24		x	x	x
160	<b>DCA</b>	-1458	-1407	-51	<b>UDCA</b>	-1303	x	x
320		-1464	-1403	-61		-1305	x	x
640		-1469	-1399	-70		-1307	-1288	-19
1280		-1484	-1388	-96		-1312	-1286	-26
2560		-1501	-1374	-127		-1314	-1274	-40

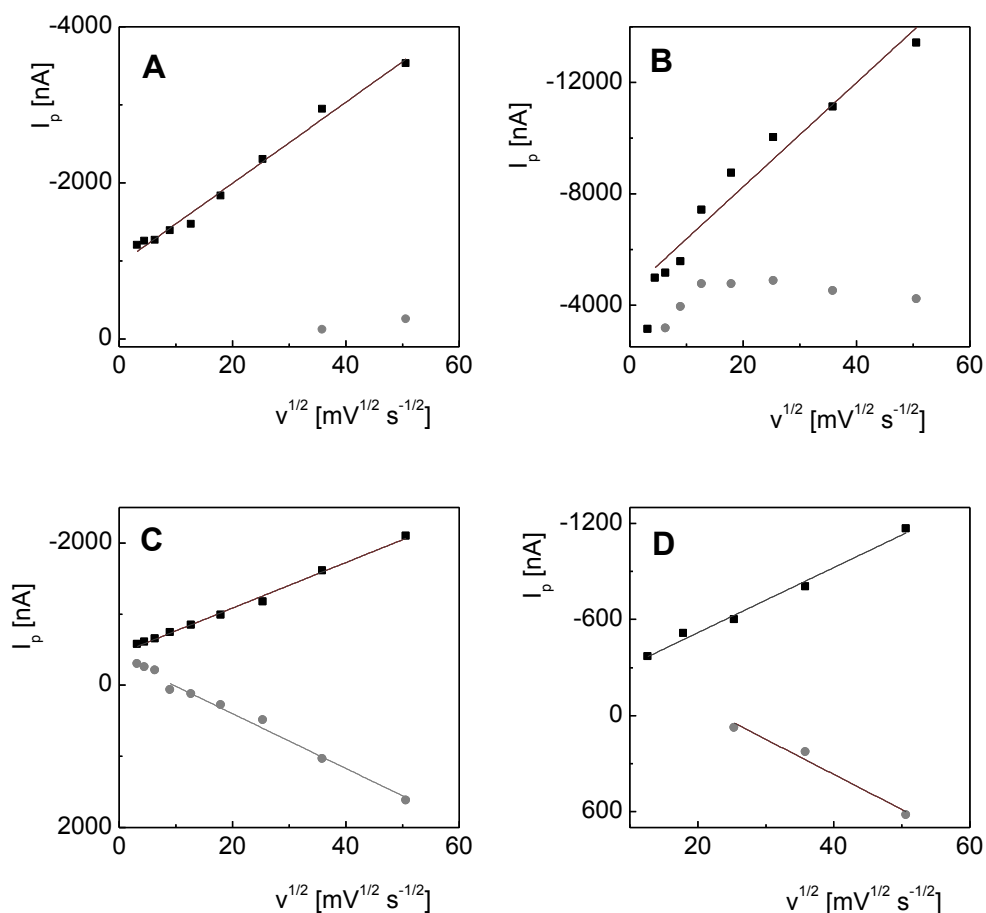
<sup>a</sup> vrchol píku v anodickém směru polarizace obrácen do katodické oblasti

**Tab. 3.5:** Hodnoty proudu výšky píku pro katodický pík ( $I_{p,k}$ ), pro anodický pík ( $I_{p,a}$ ) a jejich podílu ( $I_{p,k} / I_{p,a}$ ) pro žlučové kyseliny o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (kyseliny: CA – cholová; GCA – glykocholová; DCA – deoxycholová; UDCA – ursodeoxycholová). Hodnoty naměřené metodou CV na m-AgSAE v prostředí Brittonova – Robinsonova pufru a methanolu (9:1) o pH 4,0 při různých rychlostech scanu ( $\nu$ ).

$\nu$ ( $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ )	BA	$I_{p,k}$ (mV)	$I_{p,a}$ (mV)	$I_{p,k} / I_{p,a}$ (mV)	BA	$I_{p,k}$ (mV)	$I_{p,a}$ (mV)	$I_{p,k} / I_{p,a}$ (mV)
10		-1207	x	x		-3141	x	x
20		-1256	x	x		-4981	x	x
40		-1266	x	x		-5162	-3178 <sup>a</sup>	1,6
80		-1392	x	x		-5574	-3941 <sup>a</sup>	1,4
160	<b>CA</b>	-1474	x	x	<b>GCA</b>	-7415	-4765 <sup>a</sup>	1,6
320		-1834	x	x		-8751	-4756 <sup>a</sup>	1,8
640		-2305	x	x		-10030	-4881 <sup>a</sup>	2,1
1280		-2950	-124	11,4		-11130	-4526 <sup>a</sup>	2,5
2560		-3534	-259	13,6		-13430	-4226 <sup>a</sup>	3,2
10		-578	-306 <sup>a</sup>	1,9		x	x	x
20		-610	-257 <sup>a</sup>	2,4		x	x	x
40		-659	-214 <sup>a</sup>	3,1		x	x	x
80		-746	63	-11,8		x	x	x
160	<b>DCA</b>	-850	121	-7,1	<b>UDCA</b>	-369	x	x
320		-992	273	-3,6		-515	x	x
640		-1176	484	-2,4		-600	74	-8,1
1280		-1617	1029	-1,6		-805	226	-3,6
2560		-2103	1616	-1,3		-1168	620	-1,9

<sup>a</sup> vrchol píku v anodickém směru polarizace obrácen do katodické oblasti

Do grafů v obrázku obr. 3.5 byly vyneseny závislosti výšky katodických i anodických píků na druhé odmocnině z rychlosti scanu. Pro všechny látky byla tato závislost lineární. Linearita katodických píků vypovídá o řízení dějů difúzí. Parametry lineárních závislostí jsou zaznamenány v tab. 3.6. Pro anodické píky byla linearita určována jen pro anodický pík DCA v oblasti, kdy byl vrchol klasicky obrácen do anodické oblasti, a pro UDCA, kdy byl pík zřejmý při vyšších rychlostech scanu.



**Obr. 3.5:** Graf závislosti výšky katodického (■) a anodického píku (●) –  $I_p$  na druhé odmocnině rychlosti scanu  $v^{1/2}$  cyklické voltametrie pro kyselinu A – cholovou, B – glykocholovou, C – deoxycholovou a D – ursodeoxycholovou o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v prostředí Brittonova – Robinsonova pufru o pH 4,0 a methanolu (9:1) na m-AgSAE.

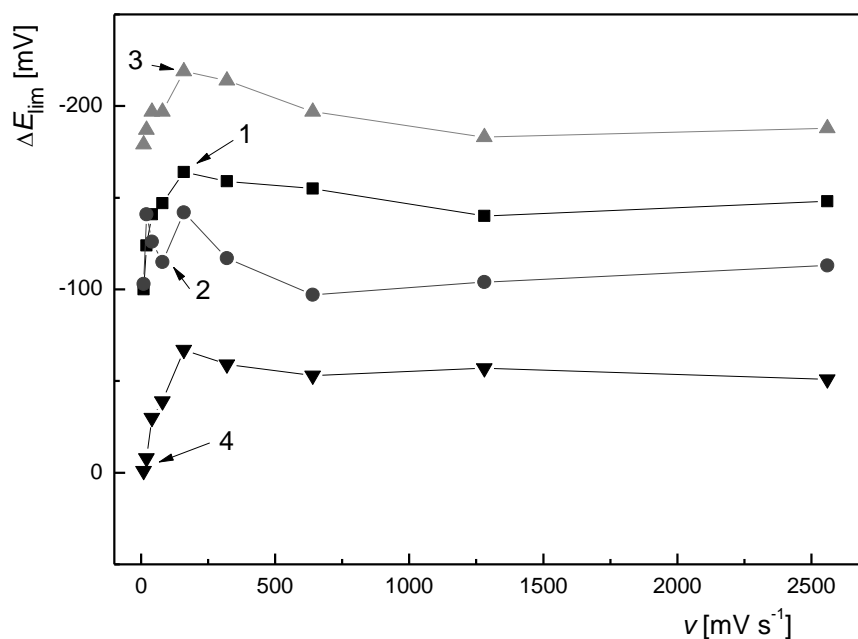
**Tab. 3.6:** Parametry lineárních závislostí proudu katodického (K) a anodického (A) píku na druhé odmocnině rychlosti polarizace žlučových kyselin (kyselina cholová – CA, glykocholová – GCA, deoxycholová – DCA a ursodeoxycholová – UDCA). Měřeno na m-AgSAE v prostředí Brittonova – Robinsonova pufru o pH 4,0.

Žlučová kyselina	Oblast	Rozsah rychlostí ( $\text{mV}^{1/2} \cdot \text{s}^{-1/2}$ )	Směrnice přímky ( $\text{nA} \cdot \text{mV}^{-1/2} \cdot \text{s}^{1/2}$ )	Úsek (nA)	Korelační koeficient R
CA	K	10 – 2560	–51,9	–959,8	0,994
GCA	K	20 – 2560	–187,2	–4520,5	0,975
DCA	K	10 – 2560	–32,1	–448,6	0,997
	A	10 – 2560	38,5	–372,8	0,994
UDCA	K	160 – 2560	–20,4	–112,4	0,993
	A	640 – 2560	21,9	–509,1	0,977

Stejně jako u metody DPV byl i při metodě CV pozorován odlišný potenciál úniku základního elektrolytu v přítomnosti a nepřítomnosti žlučové kyseliny. V tabulce 3.7 jsou odečtené hodnoty limitního potenciálu ( $E_{\text{lim}}$ ) pro katodický únik elektrolytu s příslušnou žlučovou kyselinou ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a základního elektrolytu (BR pufr – pH 4,0 a methanol, 9:1) pro různé rychlosti scanu. Obr. 3.6 ukazuje závislost rozdílu potenciálů  $\Delta E_{\text{lim}}$  katodického úniku elektrolytu v přítomnosti a nepřítomnosti žlučové kyseliny na rychlosti scanu.

Pro všechny zkoumané žlučové kyseliny platí, že při všech rychlostech scanu dochází ke katodickému úniku v přítomnosti základního elektrolytu se žlučovou kyselinou později než samotného základního elektrolytu; u metody DPV ve stejném prostředí a rychlosti  $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  tomu bylo naopak (UDCA) nebo nebyl rozdíl potenciálů výrazný (DCA, CA, GCA). S rostoucí rychlostí scanu rozdíl katodických úniků roste, do rychlosti  $160 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ . Od této rychlosti zůstává jeho hodnota pro všechny kyseliny téměř konstantní. Rozdíl katodických úniků pro CA a DCA je větší v porovnání s GCA a UDCA. Opět lze předpokládat, že vlivem adsorpce kyselin na povrch m-AgSAE dochází k inhibici vývoje vodíku a posunu okna záporným směrem v přítomnosti žlučové kyseliny, nejvíce u DCA a CA. U kyseliny deoxycholové je možno toto chování vysvětlit silnou adsorpcí na povrch elektrody, což dokazuje

tvorba dvojpíku, jak bylo popsáno výše. Kyselina cholová je zase v tomto prostředí zcela rozpuštěna a je tedy pravděpodobné, že dochází také k silné adsorpci CA. Potenciál píku CA však leží záporněji než u DCA (viz tab. 3.4), tj. blíže úniku základního elektrolytu a pro tvorbu následného píku není v rámci potenciálového okna dostatečný prostor.



**Obr. 3.6:** Závislost rozdílu potenciálů  $\Delta E_{lim}$  katodického úniku elektrolytu v přítomnosti žlučové kyseliny a základního elektrolytu na rychlosti scanu. Hodnoty naměřené metodou CV na m-AgSAE v prostředí Brittonova – Robinsonova pufru (pH 4,0) a methanolu (9:1) pro žlučové kyseliny o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Rozdíl potenciálů katodického úniku elektrolytu v přítomnosti kyseliny 1 – cholové, 2 – glykocholové, 3 – deoxycholové, 4 – ursodeoxycholové a základního elektrolytu.

**Tab. 3.7:** Hodnoty limitního potenciálu ( $E_{\text{lim}}$ ) pro katodický únik elektrolytu pro základní elektrolyt v nepřítomnosti ( $E_{\text{lim, ZE}}$ ) a přítomnosti žlučové kyseliny ( $E_{\text{lim, BA}}$ ) o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (kyseliny: CA – cholová; GCA – glykocholová; DCA – deoxycholová; UDCA – ursodeoxycholová) odečtené při hodnotě katodického proudu  $I_k$  a jejich rozdílu  $\Delta E_{\text{lim}}$  ( $E_{\text{lim, BA}} - E_{\text{lim, ZE}}$ ). Hodnoty naměřené metodou CV na m-AgSAE v prostředí Brittonova – Robinsonova pufru a methanolu (9:1) o pH 4,0 při různých rychlostech scanu ( $\nu$ ).

$\nu$ ( $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ )	BA	$I_k$ (nA)	$E_{\text{lim, BA}}$ (mV)	$E_{\text{lim, ZE}}$ (mV)	$\Delta E_{\text{lim}}$ (mV)	BA	$I_k$ (nA)	$E_{\text{lim, BA}}$ (mV)	$E_{\text{lim, ZE}}$ (mV)	$\Delta E_{\text{lim}}$ (mV)
10		-2000	-1567	-1467	-100		-5000	-1672	-1569	-103
20		-2000	-1569	-1445	-124		-5000	-1669	-1528	-141
40		-2000	-1572	-1431	-141		-5000	-1667	-1541	-126
80		-2000	-1571	-1424	-147		-5000	-1649	-1534	-115
160	<b>CA</b>	-2000	-1571	-1407	-164	<b>GCA</b>	-5000	-1648	-1506	-142
320		-2000	-1587	-1428	-159		-5000	-1632	-1515	-117
640		-4000	-1635	-1480	-155		-8000	-1674	-1577	-97
1280		-4000	-1618	-1478	-140		-8000	-1675	-1571	-104
2560		-4000	-1619	-1471	-148		-8000	-1663	-1550	-113
10		-800	-1546	-1367	-179		-3000	-1515	-1514	-1
20		-800	-1543	-1356	-187		-3000	-1503	-1495	-8
40		-800	-1543	-1346	-197		-3000	-1508	-1478	-30
80		-900	-1546	-1349	-197		-3000	-1509	-1470	-39
160	<b>DCA</b>	-900	-1539	-1320	-219	<b>UDCA</b>	-3000	-1510	-1443	-67
320		-900	-1535	-1321	-214		-3000	-1508	-1449	-59
640		-1800	-1582	-1385	-197		-5000	-1561	-1508	-53
1280		-1800	-1577	-1394	-183		-5000	-1555	-1498	-57
2560		-1800	-1569	-1381	-188		-5000	-1546	-1495	-51

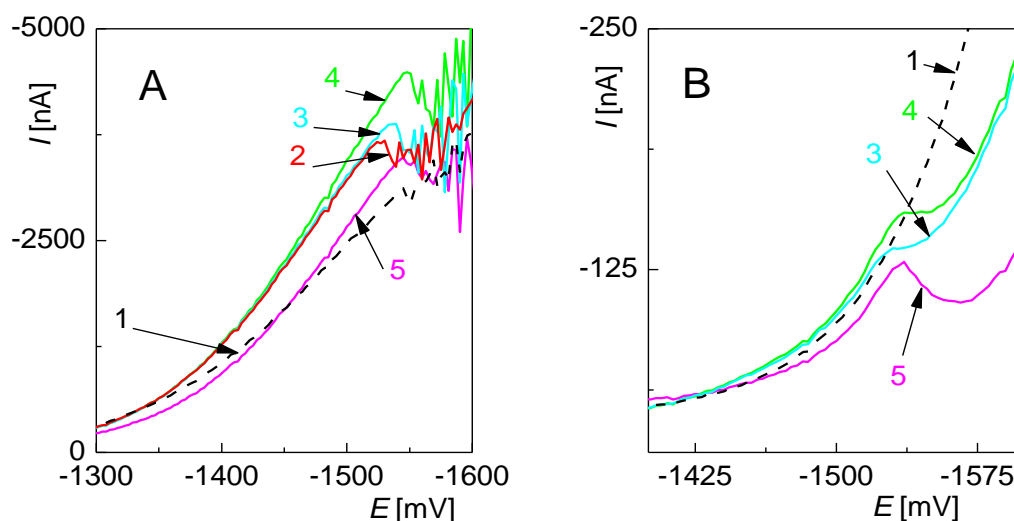


### 3.1.3 Možnosti stanovení kyseliny glykcholové

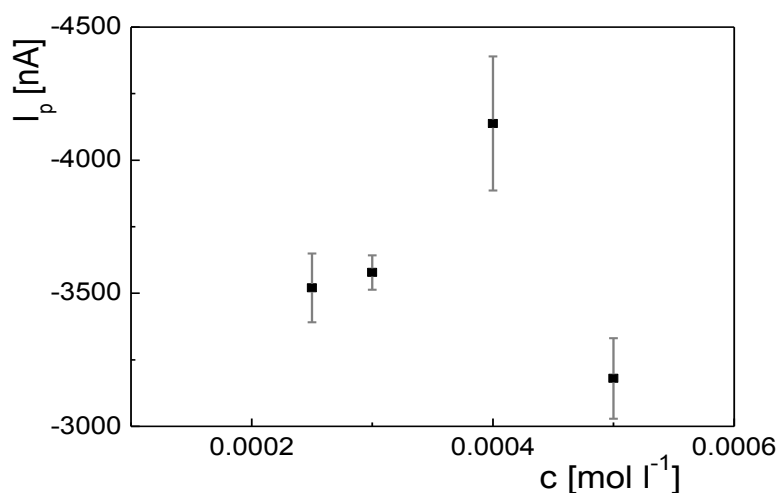
#### 3.1.3.1 Koncentrační závislost v přítomnosti methanolu v roztoku

Z pěti studovaných kyselin byla pro bližší studium vybrána GCA a byly studovány možnosti jejího stanovení na m-AgSAE v nepřítomnosti organického rozpouštědla a v přítomnosti methanolu a tetrahydrofuranu metodou DPV.

Byla studována její koncentrační závislost v rozmezí koncentrací v prostředí BR pufru a methanolu (9:1) pro pH BR pufrů 4,0 a 9,0 a v prostředí borátového pufru ( $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) o pH 9,0 a methanolu (9:1). Stejná prostředí byla použita v předchozích studiích věnovaných studiu elektrochemického chování žlučových kyselin [62, 63, 66]. Výsledek měření v prostředí borátového pufru byl obdobný s měřením v prostředí BR pufru o pH 9,0. V pH 4,0 je možné detekovat GCA od koncentrace  $2,5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  výše (DP voltamogramy obr. 3.7 A) a v pH 9,0 od koncentrace  $3\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (obr. 3.7 B). Jak je vidět z obr. 3.8, v prostředí o pH 4,0 nelze sestavit lineární kalibrační závislost. V oblasti úniku základního elektrolytu docházelo opakovaně k výraznému zvýšení šumu, který komplikoval vyhodnocení výšky píků. V prostředí o pH 9,0 je výška píku v přítomnosti základního elektrolytu opět ovlivněna posunem úniku základního elektrolytu do oblasti zápornějších potenciálů. Pro vyšší koncentraci GCA je pík výraznější (viz obr. 3.7, křivka 7), nicméně ke kvantifikaci GCA jej opět využít nelze. Vyšší koncentraci GCA než  $5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  pro poměr methanol a BR pufr 1:9 a zásobní roztok o koncentraci  $1\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  připravit nelze. Měřením na m-AgSAE tedy lze dokázat přítomnost GCA v roztoku, ale ne stanovit její koncentraci.



**Obr. 3.7:** DP voltamogramy kyseliny glykocholové o různé koncentraci naměřené na m-AgSAE ve směsi Brittonova – Robinsonova pufru a methanolu (9:1) o pH (A) 4,0 a (B) 9,0. Koncentrace kyseliny glykocholové ( $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ): 1) 0; 2)  $2,5\cdot 10^{-4}$ ; 3)  $3\cdot 10^{-4}$ ; 4)  $4\cdot 10^{-4}$ ; 5)  $5\cdot 10^{-4}$ .



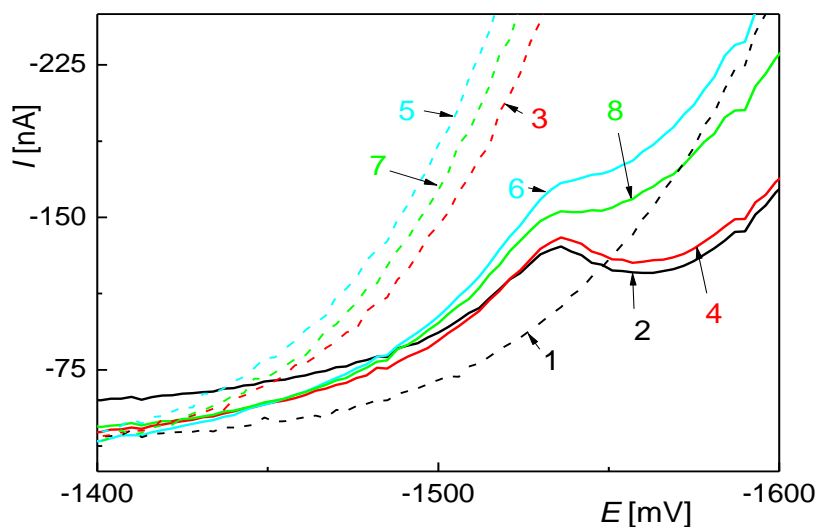
**Obr. 3.8:** Kalibrační závislost proudu píku v maximum jeho výšky na koncentraci kyseliny glykocholové v BR pufru a methanolu (9:1) o pH 4,0. Koncentrace kyseliny glykocholové ( $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ):  $2,5\cdot 10^{-4}$ ;  $3\cdot 10^{-4}$ ;  $4\cdot 10^{-4}$ ;  $5\cdot 10^{-4}$  měřená na m-AgSAE. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku proudu píku v maximum jeho výšky (počet měření: 5).

### 3.1.3.2 Vliv množství methanolu na výsledek měření

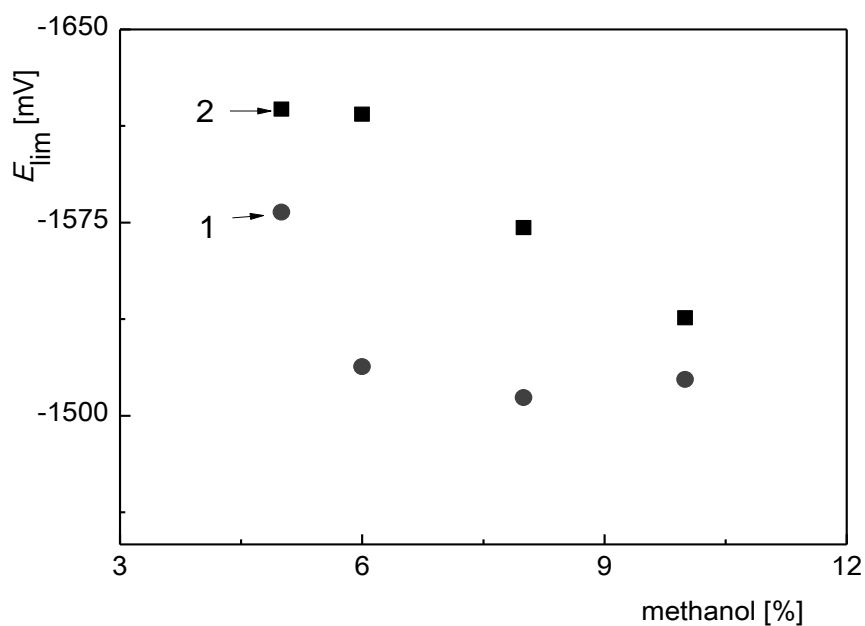
Protože zásobní roztoky žlučových kyselin byly připraveny v methanolu, byl zkoumán vliv množství methanolu na DP voltamogramy GCA na m-AgSAE. Je známo, že methanol se adsorbuje na elektrody na bázi rtuti. Základní elektrolyty byly tvořeny BR pufrům o pH 9,0 a proměnlivém množství methanolu (5 %; 6 %, 8 % a 10 %). Koncentrace GCA v měřených roztocích byla vždy  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Záznam DP voltamogramů je na obr. 3.9. Na obrázku 3.10 je závislost potenciálů  $E_{\text{lim}}$  katodického úniku elektrolytu v nepřítomnosti a v přítomnosti kyseliny glykocholové o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  na množství methanolu v roztoku.

Z obr. 3.9 a obr. 3.10 je patrné, že s přibývajícím množstvím methanolu dochází ke zkracování potenciálového okna; tj. ke katodickému úniku elektrolytu dochází u kladnějších potenciálů. Naopak přítomnost GCA v roztoku vede k posunu potenciálového okna k zápornějším potenciálům. Tento posun je zřejmě důsledkem adsorpce GCA na povrch elektrody, jejíž přítomnost inhibuje vývoj vodíku. Přítomnost methanolu má vliv na tvar píků. Pokud je v roztoku méně methanolu, potenciálové okno je širší a pík GCA je výraznější; obojí je zřejmě způsobeno silnější adsorpcí GCA.

Je tedy evidentní, že přítomnost methanolu negativně ovlivňuje signál GCA pro DPV. Methanol se pravděpodobně adsorbuje na elektrodu a snižuje tak možnost adsorpce GCA. proto byla testována další rozpouštědla a dále možnost stanovení GCA v nepřítomnosti organického rozpouštědla.



**Obr. 3.9:** DP voltamogram vlivu množství methanolu na výsledek měření. Měřeno v roztoku Brittonova – Robinsonova pufru o pH 9,0 a methanolu na m-AgSAE. Základní elektrolyt bez kyseliny glykocholové (GCA) – přerušovaně; množství methanolu v roztoku: 1) 5 %; 3) 6 %; 5) 8 %; 7) 10 %. Koncentrace GCA  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , množství methanolu v roztoku: 2) 5 %; 4) 6 %; 6) 8 %; 8) 10 %.



**Obr. 3.10:** Závislost potenciálů  $E_{\text{lim}}$  katodického úniku elektrolytu (1, ●) v nepřítomnosti a (2, ■) v přítomnosti kyseliny glykocholové o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  na množství methanolu v roztoku. Hodnoty naměřené metodou DPV na m-AgSAE v prostředí Brittonova – Robinsonova pufru (pH 9,0) a methanolu. Hodnoty  $E_{\text{lim}}$  byly odečteny pro proud o velikosti  $-200 \text{ nA}$ .

### 3.1.3.3 Koncentrační závislost v nepřítomnosti methanolu v roztoku

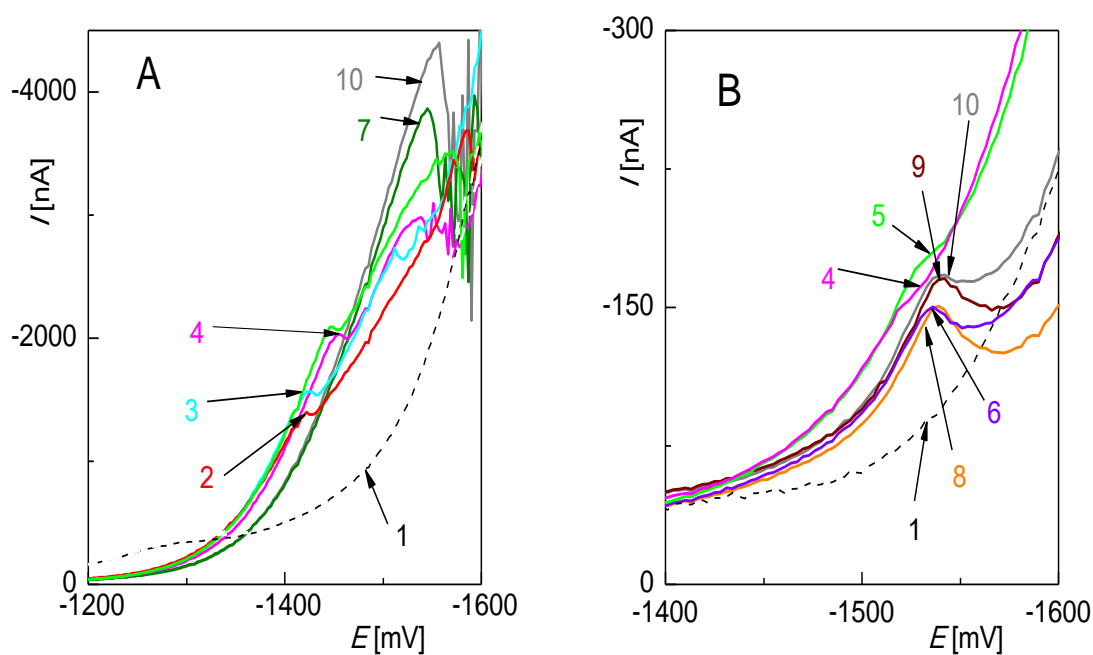
Jelikož bylo dokázáno, že přítomnost methanolu negativně ovlivňuje měření, bylo testováno další rozpouštědlo mísitelné s vodou – tetrahydrofuran (THF). Hodnota relativní permitivity THF je 7,58. Na rozdíl od protického methanolu (relativní permitivita 32,7) se tedy jedná o nepolární rozpouštědlo, které je donorem elektronového páru [67].

Dále byla GCA rozpouštěna v samotném borátovém pufru o pH 9,0. Kyselina glykocholová v borátovém pufru byla rozpuštěna až při její koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Měření tohoto roztoku metodou DPV na m-AgSAE neposkytovalo žádný signál. V samotném vodném roztoku bez přítomnosti organického rozpouštědla, které umožní rozpuštění GCA, tedy nelze tuto kyselinu na m-AgSAE detekovat.

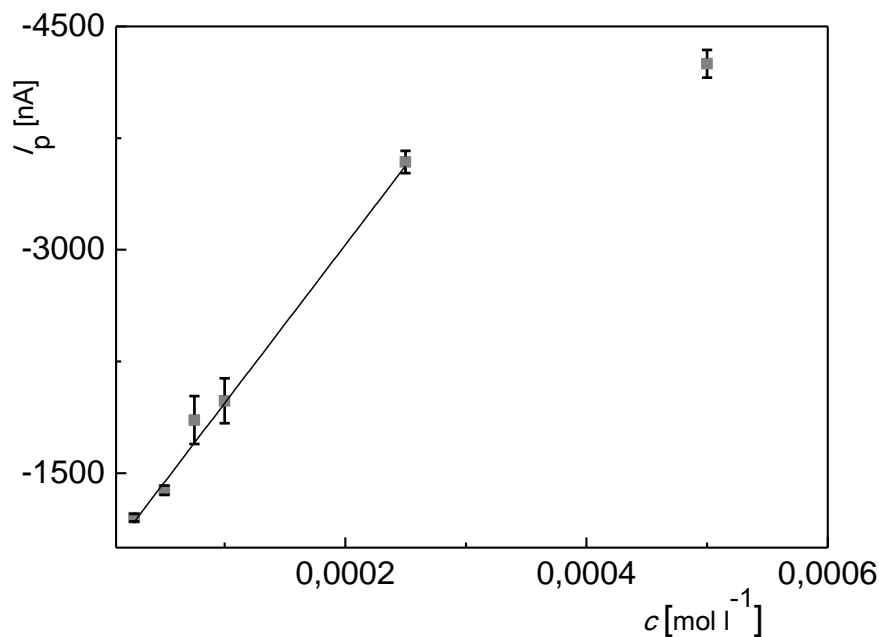
V přítomnosti tetrahydrofuranu byla analogicky jako v přítomnosti methanolu v prostředí BR pufrů (pH 4,0 a 9,0) a borátového pufru ( $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; pH 9,0) měřena koncentrační závislost GCA. Obsah THF byl opět k vodné složce v poměru 1:9. Stejně jako v prostředí s přítomným metanolem byl výsledek měření v prostředí borátového pufru totožný s měřením v prostředí BR pufru. Na obrázku 3.11 B je tudíž uveden jeden graf pro pH 9,0, a to s BR pufrém.

V prostředí BR pufru a THF (9:1) o pH 4,0 (voltamogramy viz obr. 3.11 A) je GCA detekovatelná od koncentrace  $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , což je o řád méně v porovnání se stanovením v přítomnosti methanolu. Lze sestavit kalibrační závislost (na obr. 3.12), která je v rozmezí koncentrací  $2,5 \cdot 10^{-5}$  až  $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  lineární. Parametry kalibrační přímky jsou zapsány v tab. 3.8. Zároveň pro píky v pH 4,0 platí, že s přibývajícím koncentrací GCA se potenciály píků posouvají k zápornějším hodnotám, což je jev typický pro látky, které se adsorbují na elektrodu.

V pH 9,0 je GCA detekovatelný od koncentrace  $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , nicméně v tomto prostředí GCA nevykazuje lineární závislost na koncentraci, jak je patrné z voltamogramů na obr. 3.11 B. V pH 9,0 tedy nelze stanovit koncentraci GCA z výšky naměřeného píku. Z obr. 3.11 je patrné, že s přibývajícím koncentrací GCA dochází k posunu katodického úniku elektrolytu k zápornějším hodnotám. V pH 9,0 jsou píky všech koncentrací GCA pozorovatelné při přibližně stejné hodnotě potenciálu.



**Obr. 3.11:** DP voltamogramy koncentrační závislosti kyseliny glykocholové (GCA) rozpuštěné v tetrahydrofuranu (THF) naměřené na m-AgSAE v Brittonově – Robinsonově (BR) pufru (A) pH 4,0 a (B) 9,0 a THF (9:1). Koncentrace GCA: 1)  $0 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; 2)  $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; 3)  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; 4)  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; 5)  $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; 6)  $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; 7)  $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; 8)  $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; 9)  $4 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; 10)  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .



**Obr. 3.12:** Kalibrační závislost proudu píku v maximu jeho výšky na koncentraci kyseliny glykocholové v BR pufru o pH 4,0 a tetrahydrofuranu (9:1). Měřeno metodou DP voltametrie naměřená na m-AgSAE. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku proudu píku v maximu jeho výšky (počet měření: 5).

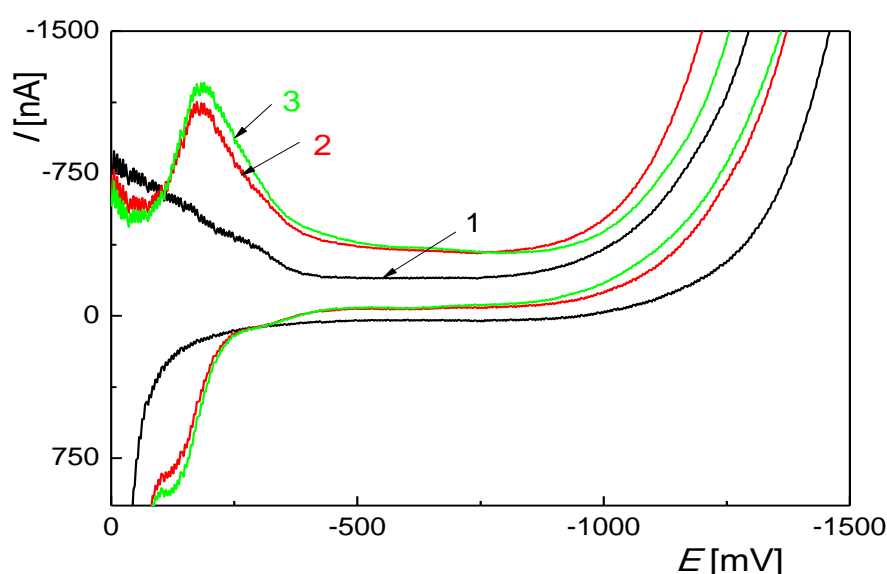
**Tab. 3.8:** Parametry kalibrační přímky pro stanovení kyseliny glykocholové metodou DPV na m-AgSAE v prostředí Brittonova - Robinsonova pufru (pH 4,0) a tetrahydrofuranu (9:1).

Lineární dynamický rozsah (mol·l <sup>-1</sup> )	směrnice přímky (nA·mol <sup>-1</sup> ·l)	úsek (nA)	korelační koeficient R	LOD (mol·l <sup>-1</sup> )	LOQ (mol·l <sup>-1</sup> )
$2,5 \cdot 10^{-5} - 2,5 \cdot 10^{-4}$	$-1,06 \cdot 10^7$	-938	0.996	$1,65 \cdot 10^{-5}$	$5,45 \cdot 10^{-5}$

### 3.1.3.4 Vliv přítomnosti kyseliny glykocholové na elektrochemickou odezvu redoxního markeru

Předpokládaná adsorpce GCA na povrch elektrody může ovlivnit přenos elektronů pro další elektroaktivní systémy. Proto byla elektrochemická odezva redoxního markeru  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$ , který zpravidla poskytuje reversibilní odezvu

v oblasti potenciálů  $-100$  mV až  $-300$  mV, což je v rozsahu potenciálového okna m-AgSAE, studována v přítomnosti a nepřítomnosti GCA. Měření probíhalo metodou CV s rychlostí  $320 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  v roztoku tvořeném chloridem draselným ( $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), BR pufr o pH 4,0 a methanolem (10 % roztoku). Na obr. 3.13 lze pozorovat, že v přítomnosti kyseliny glykocholové a markeru v roztoku dochází k mírnému nárůstu proudu v maximu výšky píku oproti roztoku neobsahujícímu GCA. Přítomnost GCA neovlivňuje rychlost přenosu elektronu, jelikož hodnota rozdílu anodického a katodického píku v maximu výšky píků zůstává stejná. Lze konstatovat, že vliv GCA na odezvu  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$  je nevýznamný.



**Obr. 3.13:** Cyklické voltamogramy  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$  ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) naměřené rychlostí scanu  $320 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  na m-AgSAE v přítomnosti a nepřítomnosti kyseliny glykocholové. Základní elektrolyt: chlorid draselný ( $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), BR pufr o pH 4,0 a methanol (vodná složka: methanol 9:1). 1) základní elektrolyt; 2)  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$  bez GCA; 3)  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$  v přítomnosti GCA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

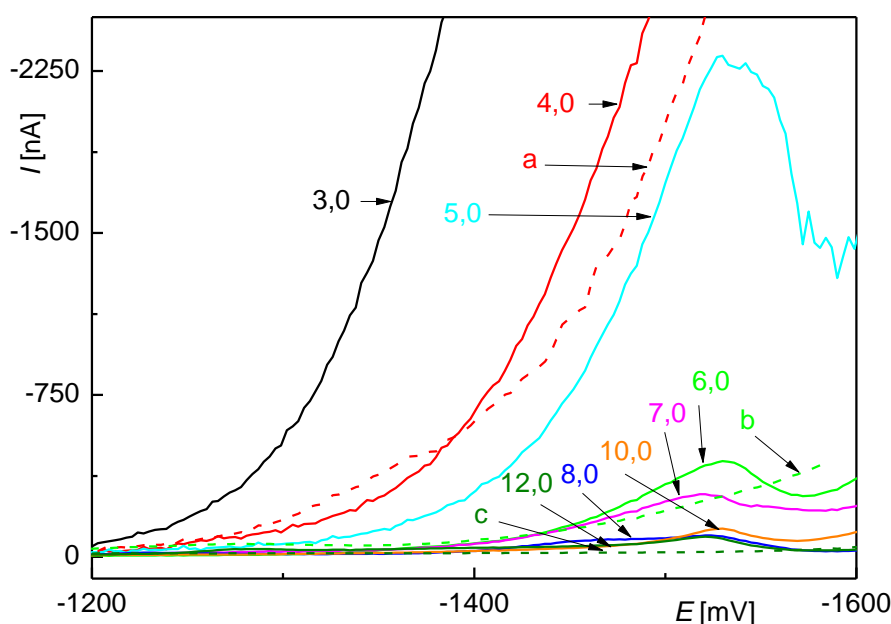
## 3.2 Visící rtuťová kapková elektroda

### 3.2.1 DP voltametrie kyseliny glykocholové

Elektrochemické chování při měření na HMDE bylo studováno pro GCA; chování ostatních studovaných kyselin kromě kyseliny cholové a lithocholové bylo již



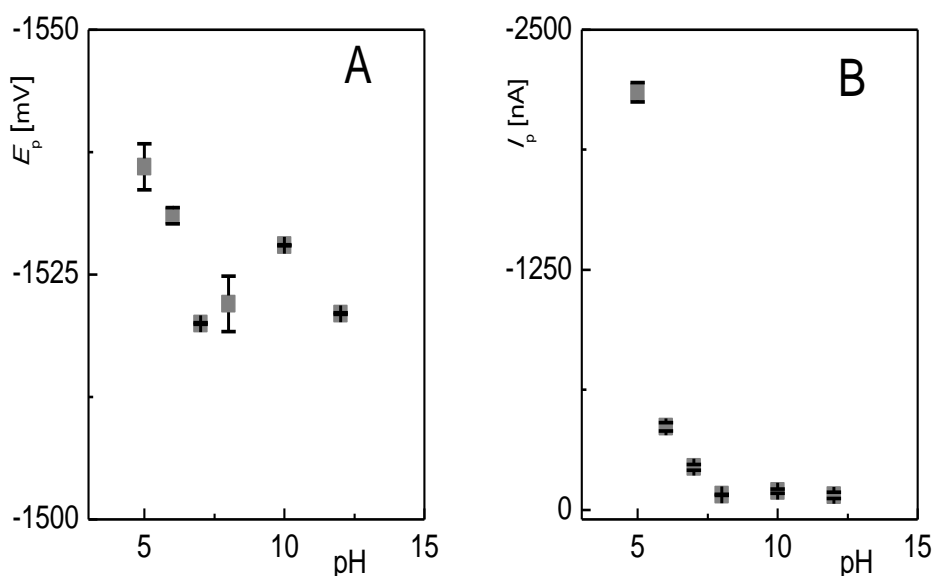
na této elektrodě charakterizováno v bakalářské práci [62]. Stejně jako pro m-AgSAE byla zkoumána pH závislost pro DP voltamogramy kyseliny (obr. 3.14) v rozsahu pH 3,0 až 12,0. Měření probíhalo v prostředí BR pufrů a methanolu (9:1). Hodnoty potenciálu a proudu odpovídající maximu piku kyseliny glykocholové jsou zaznamenány v tab. 3.9. Na obr. 3.15 je grafická podoba této tabulky. Oproti m-AgSAE nelze na HMDE naměřit pík GCA v prostředí pH 3,0 a 4,0, (tj. při hodnotách pH nižších nebo srovnatelných s hodnotou  $pK_a$  kyseliny glykocholové), kdy k vývoji vodíku a úniku elektrolytu dochází v kladnějších potenciálech oproti předpokládanému výskytu piku. V pH 5,0 je na HMDE možno měřit pro GCA pík, který je podstatně vyšší oproti ostatním pH. Jeho výška je přibližně stejná v porovnání s měřením na m-AgSAE. Hodnota proudu v maximu výšky piku na HMDE se pohybuje okolo  $-2175$  nA, na m-AgSAE okolo  $-2552$  nA. S rostoucím pH se pak pík výrazně snižuje, zatímco potenciál zůstává přibližně konstantní.



**Obr. 3.14:** DP voltamogramy na HMDE kyseliny glykocholové o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v prostředí Brittonova – Robinsonova (BR) pufru a methanolu (9:1). Čísla v grafu odpovídají hodnotě pH BR pufru. Základní elektrolyt (přerušovaně) – pH BR pufru: a – 4,0; b – 6,0; c – 12,0.

**Tab. 3.9:** Hodnoty potenciálu ( $E_p$ ) a proudu ( $I_p$ ) odpovídající maximu píku kyseliny glykocholové o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  v prostředí Brittonova - Robinsonova pufru a methanolu (9:1) pro pH pufru 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 10,0 a 12,0 naměřené metodou DPV na HMDE.

pH	$E_p$ (mV)	$I_p$ (nA)
5,0	-1536	-2175
6,0	-1531	-432
7,0	-1520	-222
8,0	-1522	-78
10,0	-1528	-97
12,0	-1521	-76



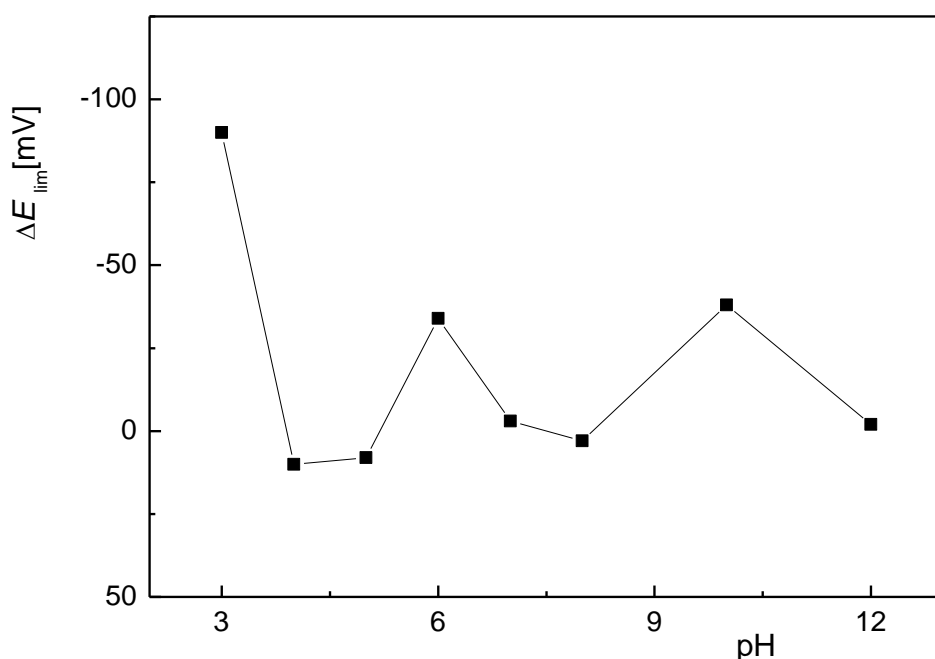
**Obr. 3.15:** (A) Graf závislosti potenciálu píku  $E_p$  a (B) výšky píku  $I_p$  na pH. Hodnoty naměřené metodou DPV na HMDE pro kyselinu glykocholovou o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v prostředí Brittonova - Robinsonova pufru a methanolu (9:1). Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku (A) potenciálu píku  $E_p$  a (B) výšky píku  $I_p$  (počet měření: 5).

Při srovnání hodnot limitního potenciálu pro katodický únik základního elektrolytu a elektrolytu v přítomnosti kyseliny glykocholové (v tab. 3.10 a na obr. 3.16, kde jsou znázorněny hodnoty  $\Delta E_{\text{lim}}$  v závislosti na pH BR pufru) je patrné, že k zásadnějšímu rozdílu dochází pouze v pH 3,0. V ostatních pH dochází k úniku

základního elektrolytu a elektrolytu kyseliny glykocholové přibližně při stejných potenciálech. Je zde tedy evidentní rozdíl oproti m-AgSAE, kde v roztocích majících kyselé pH dochází ke katodickému úniku základního elektrolytu v přítomnosti žlučové kyseliny při kladnějším potenciálu než leží katodický únik základního elektrolytu a v roztocích s pH od 5,0 až 6,0 je tomu naopak. Tento rozdíl je zřejmě daný jiným charakterem povrchu obou elektrod, kdy povrch m-AgSAE díky postupné amalgamací není atomicky hladký jako povrch HMDE a je tak zřejmě náchylnější k adsorpci GCA.

**Tab. 3.10:** Hodnoty limitního potenciálu ( $E_{\text{lim}}$ ) pro katodický únik elektrolytu pro základní elektrolyt ( $E_{\text{lim, ZE}}$ ) a kyselinu glykocholovou ( $E_{\text{lim, GCA}}$ ) o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  odečtené při hodnotě katodického proudu  $I_k$  a jejich rozdílu  $\Delta E_{\text{lim}}$  ( $E_{\text{lim, BA}} - E_{\text{lim, ZE}}$ ). Hodnoty naměřené metodou DPV na HMDE v prostředí Brittonova – Robinsonova pufru a methanolu (9:1) o pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 10,0 a 12,0.

pH	$I_k$ (nA)	$E_{\text{lim, ZE}}$ (mV)	$E_{\text{lim, GCA}}$ (mV)	$\Delta E_{\text{lim}}$ (mV)
3,0	-8000	-1490	-1580	-90
4,0	-6000	-1622	-1612	10
5,0	-6000	-1737	-1729	8
6,0	-400	-1574	-1608	-34
7,0	-4000	-1873	-1876	-3
8,0	-1000	-1838	-1835	3
10,0	-1000	-1781	-1819	-38
12,0	-1000	-1830	-1832	-2



**Obr. 3.16:** Závislost rozdílu potenciálů  $\Delta E_{lim}$  úniku základního elektrolytu v přítomnosti a nepřítomnosti kyseliny glykocholové ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Hodnoty naměřené metodou DPV na HMDE v prostředí Brittonova – Robinsonova pufru a methanolu (9:1).

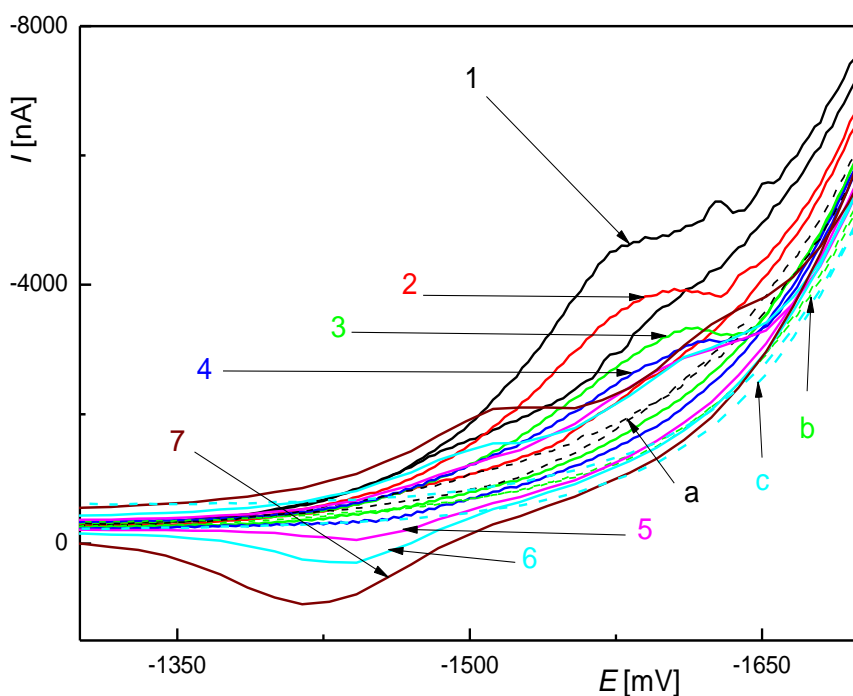
### 3.2.2 Studium povahy dějů pomocí cyklické voltametrie

Cyklická voltametrie pro GCA o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v BR pufru (pH 5,0) a methanolu (9:1) byla měřena na HMDE s rychlostmi scanu od  $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  do  $2560 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ . Cyklické voltamogramy jsou na obr. 3.17. Hodnoty potenciálu v maximu výšky píku pro katodický i anodický pík a proudu výšky píku pro katodický i anodický pík jsou zaznamenány v tab. 3.11. Závislosti výšky píku  $I_p$  na druhé odmocnině z rychlosti scanu  $v^{1/2}$  jsou vyneseny do obr. 3.18. Katodický signál byl nevýrazný v celém rozsahu rychlostí; pro nejnižší rychlosti  $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  a  $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  byl signál GCA zcela neprůkazný. Na rozdíl od měření na m-AgSAE (viz kapitola 3.1.2, měření probíhalo v prostředí BR pufru o pH 5,0 a methanolu, poměr 9:1) při měření na HMDE docházelo k poklesu hodnoty proudu píku se zvyšující se rychlostí, jak je

zřejmé z obr. 3.18. Hodnota potenciálu pro katodický pík v maximu výšky do rychlosti  $320 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  se mírně posunovala do zápornějších hodnot katodické oblasti. Od rychlosti  $640 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  docházelo k posunu zpět ke kladnějším hodnotám katodické oblasti. Toto chování se liší od chování GCA na m-AgSAE, kde docházelo k posunu potenciálu pro katodický pík pouze ve směru do zápornější katodické oblasti.

Anodický signál při reverzním scanu je pozorovatelný od rychlosti  $640 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , kdy píky svým vrcholem směřovaly do anodické oblasti a jejich velikost rostla s rostoucí rychlostí.

Hodnoty potenciálu v maximu výšky píku pro katodický pík ( $E_{p,k}$ ), pro anodický pík ( $E_{p,a}$ ), jejich rozdílu ( $\Delta E_p$ ), proudu výšky píku pro katodický pík ( $I_{p,k}$ ), pro anodický pík ( $I_{p,a}$ ) a jejich podílu ( $I_{p,k} / I_{p,a}$ ) jsou zaznamenány v tab. 3.11. Na základě hodnot  $\Delta E_p$  a  $I_{p,a}$  lze elektrochemický děj klasifikovat jako quasireversibilní.

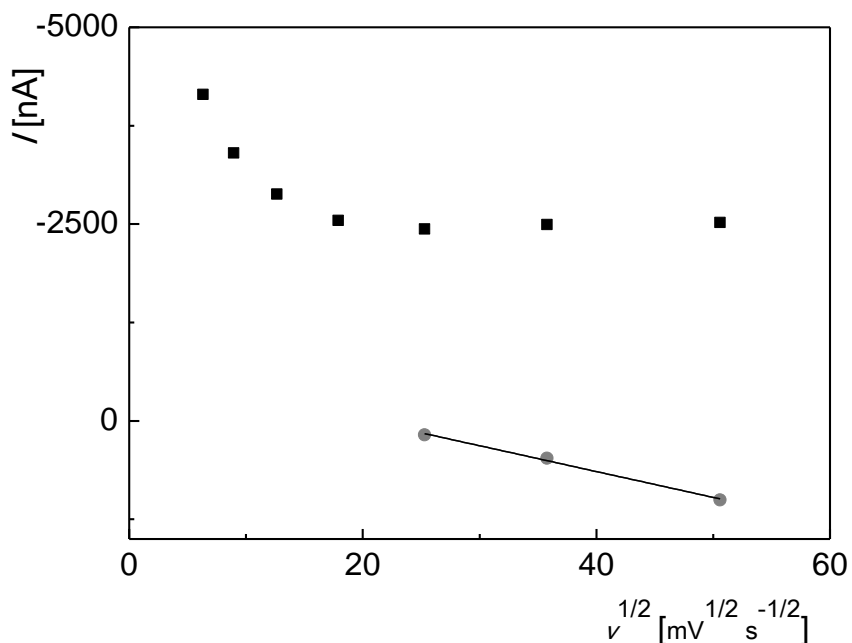


**Obr. 3.17:** Cyklické voltamogramy na HMDE pro kyselinu glykocholovou  $5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  v prostředí Brittonova – Robinsonova pufru o pH 5,0 a methanolu (9:1). Rychlosti scanu žlučových kyselin: 1)  $40 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ; 2)  $80 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ; 3)  $160 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ; 4)  $320 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ; 5)  $640 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ; 6)  $1280 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ; 7)  $2560 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . Rychlosti scanu základního elektrolytu (přerušovaně): a)  $40 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ; b)  $160 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ; c)  $1280 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

**Tab. 3.11:** Hodnoty potenciálu v maximu výšky píku pro katodický pík ( $E_{p,k}$ ), pro anodický pík ( $E_{p,a}$ ), jejich rozdílu ( $\Delta E_p$ ), proudu výšky píku pro katodický pík ( $I_{p,k}$ ), pro anodický pík ( $I_{p,a}$ ) a jejich podílu ( $I_{p,k} / I_{p,a}$ ) pro kyselinu glykocholovou o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Hodnoty naměřené metodou CV na HMDE v prostředí Brittonova – Robinsonova pufru a methanolu (9:1) o pH 4,0 při různých rychlostech scanu ( $\nu$ ).

$\nu$ ( $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$E_{p,k}$ (mV)	$E_{p,a}$ (mV)	$\Delta E_p$ (mV)	$I_{p,k}$ (nA)	$I_{p,a}$ (nA)	$I_{p,k} / I_{p,a}$
<b>40</b>	-1587	x	x	-4148	x	x
<b>80</b>	-1594	x	x	-3402	x	x
<b>160</b>	-1611	x	x	-2881	x	x
<b>320</b>	-1621	x	x	-2548	x	x
<b>640</b>	-1607	-1438	-169	-2439	178	-13,7
<b>1280</b>	-1515	-1426	-89	-2494	475	-5,3
<b>2560</b>	-1508	-1415	-93	-2519	1003	-2,5

Do grafu v obr. 3.18 byla vynesena závislost výšky píků na druhé odmocnině z rychlosti scanu. Vzhledem k tomu, že s rostoucí rychlostí scanu se výška katodických píků snižuje a pro vyšší rychlosti zůstává konstantní, nelze říci, jakou reakcí je děj u pracovní elektrody řízen. Pro anodické píky je závislost lineární od rychlosti 640  $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ ; parametry jsou zaznamenány v tabulce 3.12.



**Obr. 3.18:** Graf závislosti výšky píku  $I_p$  na druhé odmocnině z rychlosti scanu  $v^{1/2}$  pro cyklické voltamogramy kyseliny glykocholové o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v prostředí Brittonova – Robinsonova pufru o pH 5,0 a methanolu (9:1) na HMDE.

**Tab. 3.12:** Parametry lineární závislosti proudu anodického (A) píku na druhé odmocnině rychlosti polarizace kyseliny glykocholové měřené na HMDE v prostředí Brittonova – Robinsonova pufru o pH 5,0.

Rozsah rychlostí polarizace ( $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ )	Směrnice přímky ( $\text{nA} \cdot \text{mV}^{-1/2} \cdot \text{s}^{1/2}$ )	Úsek (nA)	Korelační koeficient R
640 - 2560	32,8	-669,4	0,996

V tabulce tab. 3.13 jsou pozorované hodnoty limitního potenciálu ( $E_{\text{lim}}$ ) pro katodický únik elektrolytu s kyselinou glykocholovou ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a základního elektrolytu (BR pufr pH 5,0 a methanol, 9:1) odečteného při různých rychlostech scanu. Při vyšších rychlostech od 160  $\text{mV/s}$  dochází ve shodě s m-AgSAE k úniku v přítomnosti základního elektrolytu se žlučovou kyselinou později než samotného základního elektrolytu.

**Tab. 3.13:** Hodnoty limitního potenciálu ( $E_{\text{lim}}$ ) pro katodický únik elektrolytu pro základní elektrolyt ( $E_{\text{lim, ZE}}$ ) a kyselinu glykocholovou ( $E_{\text{lim, GCA}}$ ) o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  odečtené při hodnotě katodického proudu  $I_k$  a jejich rozdílu  $\Delta E_{\text{lim}}$  ( $E_{\text{lim, BA}} - E_{\text{lim, ZE}}$ ). Hodnoty naměřené metodou CV na m-AgSAE v prostředí Brittonova – Robinsonova pufru a methanolu (9:1) o pH 5,0 při různých rychlostech scanu ( $\nu$ ).

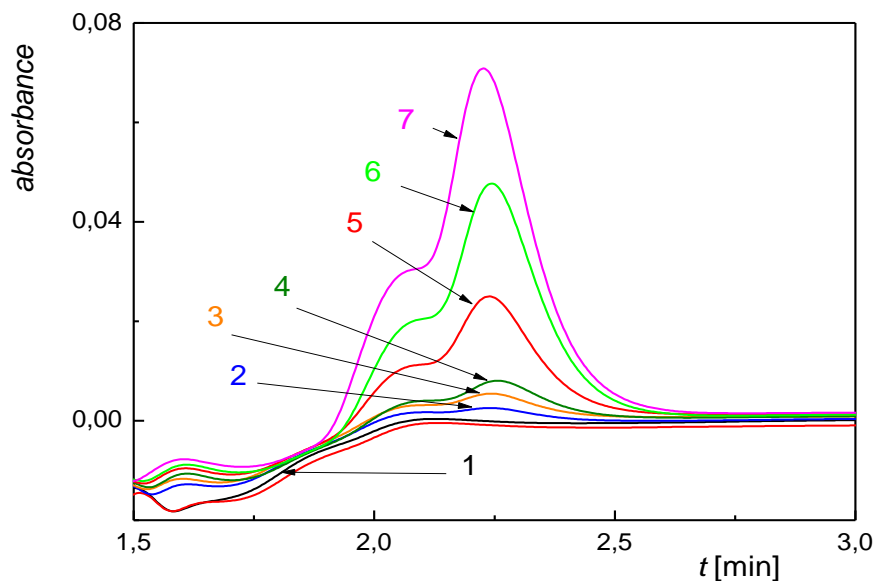
$\nu \text{ (mV} \cdot \text{s}^{-1}\text{)}$	$I_k \text{ (nA)}$	$E_{\text{lim, GCA}} \text{ (mV)}$	$E_{\text{lim, ZE}} \text{ (mV)}$	$\Delta E_{\text{lim}} \text{ (mV)}$
10	−10000	−1508	−1683	175
20	−10000	−1717	−1742	25
40	−10000	−1734	−1750	16
80	−10000	−1739	−1755	16
160	−10000	−1748	−1547	−201
320	−10000	−1749	−1562	−187
640	−10000	−1757	−1551	−206
1280	−10000	−1755	−1534	−221
2560	−10000	−1756	−1502	−254



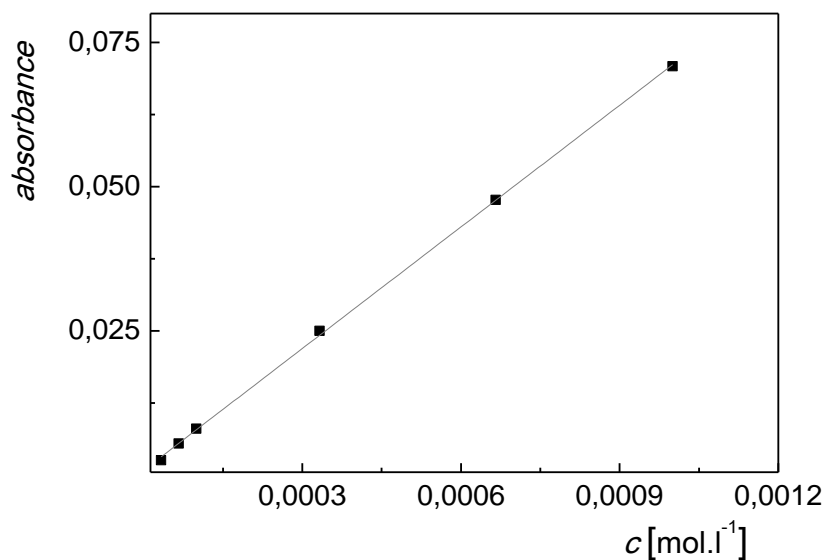
### 3.3 Elektrolýza a RP-HPLC s UV detekcí kyseliny glykocholové

Pro určení počtu vyměňovaných elektronů při redukci žlučových kyselin byla provedena elektrolýza na rtuťovém dně. Ke kvantifikaci žlučových kyselin byla použita metoda HPLC s UV detekcí při 210 nm dle modifikovaného postupu popsaného ve studii [30]. Z testovaných kyselin (kyselina cholová, glykocholová, deoxycholová, ursodeoxycholová, lithocholová, tauroursodeoxycholová, chenodeoxycholová a dehydrocholová) poskytla vyhodnotitelný signál pouze kyselina glykocholová; ostatní studované žlučové kyseliny při této vlnové délce neposkytly vyhodnotitelné signály a nižší vlnové délky nelze použít vzhledem k vysoké absorpci použité mobilní fáze. Proto byla elektrolýza provedena pouze s kyselinou glykocholovou a pro tento analyt byla vyvinuta HPLC-UV metoda stanovení.

Nejprve byla měřena koncentrační závislost GCA v rozsahu koncentrací  $1 \cdot 10^{-6}$  až  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (chromatogramy viz obr. 3.19). Retenční faktor GCA ve zvoleném HPLC systému je 0,76. Kyselina glykocholová byla ve vybraném rozsahu koncentrací detekovatelná až od koncentrace  $3,33 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Z naměřených dat byla sestavena kalibrační závislost (obr. 3.20), jejíž parametry jsou uvedeny v tab. 3.14; bylo dosaženo meze detekce  $1,46 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a meze stanovitelnosti  $4,85 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .



**Obr. 3.19:** RP-HPLC chromatogramy koncentrační závislosti kyseliny glykocholové (GCA) za použití UV detekce při 210 nm. Koncentrace GCA v  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ : 1) 0; 2)  $3,33\cdot 10^{-5}$ ; 3)  $6,66\cdot 10^{-5}$ ; 4)  $1\cdot 10^{-4}$ ; 5)  $3,33\cdot 10^{-4}$ ; 6)  $6,66\cdot 10^{-4}$ ; 7)  $1\cdot 10^{-3}$ . Mobilní fáze methanol, acetonitril,  $0,07\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  octanový pufr (pH 5,0) v poměru 55:20:25 (v/v/v). Průtoková rychlost  $0,9\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ .



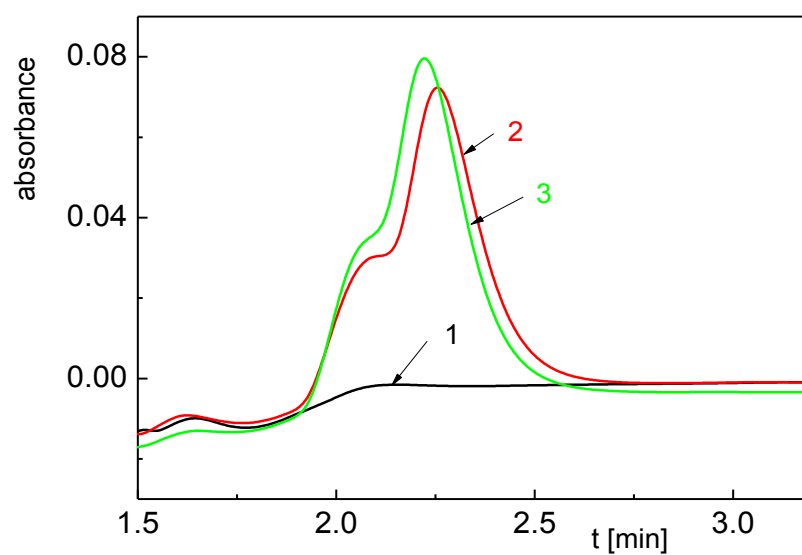
**Obr. 3.20:** Kalibrační závislost kyseliny glykocholové vyhodnocená z výšek píků měřená metodou RP-HPLC s UV detekcí při 210 nm.. Mobilní fáze methanol, acetonitril,  $0,07\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  octanový pufr (pH 5,0) v poměru 55: 20:25 (v/v/v). Průtoková rychlost  $0,9\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ .

**Tab. 3.14:** Parametry kalibrační přímky a meze detekce a stanovitelnosti pro stanovení kyseliny glykocholové metodou RP-HPLC s UV detekcí při 210 nm. Separační podmínky viz obr. 3.19.

Lineární dynamický rozsah (mol·l <sup>-1</sup> )	směrnice přímky (mol <sup>-1</sup> ·l)	Úsek	Koreleční koeficient R	LOD (mol·l <sup>-1</sup> )	LOQ (mol·l <sup>-1</sup> )
$3,33 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$	70,27	$8,48 \cdot 10^{-4}$	1,0	$1,46 \cdot 10^{-5}$	$4,85 \cdot 10^{-5}$

Elektrolýza kyseliny glykolové byla provedena na rtuťovém dně v prostředí BR pufru o pH 5,0 a methanolu (9:1) po dobu dvou hodin při vloženém potenciálu -1500 mV. Tento potenciál leží záporněji než redukce GCA na rtuťovém dně. Během elektrolýzy byly odebírány vzorky a měřeny na RP-HPLC s UV detekcí při 210 nm., díky čemuž bylo zjištěno, že se koncentrace GCA během elektrolýzy nemění (chromatogramy viz obr. 3.21). Tímto bylo dokázáno, že při voltametrickém měření nedochází k rozkladu GCA.

S využitím hodnoty proudu ( $-4,33 \cdot 10^5$  nA), při kterém probíhala elektrolýza, byl z Faradayova zákona vypočten náboj, který vyměňuje GCA na elektrodě (-1,748 C). Po vydělení této hodnoty hodnotou elementárního náboje a dobou elektrolýzy, bylo zjištěno, že GCA vyměňuje v systému  $1,46 \cdot 10^{15}$  elektronů za sekundu. Za předpokladu, že reakcí, která probíhá na elektrodě, je vývoj vodíku dle rovnice  $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$ , odpovídá uvedené množství vzniku  $7,3 \cdot 10^{14}$  molekul vodíku  $\text{H}_2$  za sekundu. Což znamená vývoj 27,2 nl vodíku za sekundu (uvažujeme-li standardní podmínky).



**Obr. 3.21:** RP-HPLC chromatogramy elektrolyzovaného roztoku kyseliny glykocholové (GCA) v Brittonově – Robinsonově pufru pH 5,0 a methanolu (9:1) měřené za použití UV detekce při 210 nm. Počáteční koncentrace GCA  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , doba ( $t$ ) elektrolyzy (2) 0 minut; (3) 120 minut. (1) ze elektrolyzovaného základního elektrolytu. Kolona –  $\text{C}_{18}$ , 125 x 4 mm,  $5 \mu\text{m}$ . Mobilní fáze methanol, acetonitril,  $0,07 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  octanový pufr (pH 5,0) v poměru 55:20:25. Průtoková rychlost  $0,9 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .

## 4. Závěr

Tato práce je věnována studiu elektrochemické redukce vybraných žlučových kyselin (kyselina cholová, kyselina glykocholová, kyselina deoxycholová, kyselina ursodeoxycholová a kyselina lithocholová) na meniskem modifikované stříbrné tuhé amalgámové elektrodě (m-AgSAE) pomocí voltametrických metod – cyklické voltametrie, diferenční pulzní voltametrie a stacionární (direct current) voltametrie a ověření možností jejich využití k voltametrickému stanovení těchto látek. Pro porovnání byla pro studium kyseliny glykocholové použita i rtuťová visící kapková elektroda.

Měření nejprve probíhala ve směsném vodně – methanolovém prostředí (9:1), kdy vodnou složku tvořil BR pufr v rozmezí pH 3,0 – 12,0. Bylo potvrzeno, že pH roztoku výrazně ovlivňuje rozpustnost žlučových kyselin, která je závislá jak na hodnotě  $pK_a$ , tak na počtu hydroxylových skupin žlučových kyselin. Ze studovaných žlučových kyselin jsou v celém rozsahu pH rozpustné CA a GCA (konjugát kyseliny cholové s glycinem); nejméně rozpustná je LCA.

Na m-AgSAE měření metodou DPV v rozsahu pH BR pufru 3,0 – 12,0 prokázala, že CA, GCA, DCA a UDCA poskytují nejvyšší píky do pH 5,0, což je přibližně do hodnoty  $pK_a$  karboxylové skupiny. Naopak LCA poskytuje nevýrazné píky až od pH 7,0. Píky všech kyselin jsou výrazně nižší v zásaditých prostředích, kdy jsou kyseliny v disociované formě. Maximum píku nastává u všech žlučových kyselin při přibližně stejných potenciálech, v rozmezí  $-1350$  až  $-1550$  mV, tedy v blízkosti úniku základního elektrolytu, jehož potenciál je ovlivněn přítomností žlučové kyseliny a pH. V roztocích majících kyselé pH dochází ke katodickému úniku elektrolytu v přítomnosti kyseliny žlučové při stejném či mírně kladnějším potenciálu než v její nepřítomnosti. V zásaditých roztocích je tomu naopak.

Studiem žlučových kyselin metodou CV v prostředí BR pufru o pH 4,0 bylo zjištěno, že katodický děj na elektrodě je řízen difúzí, ale pro některé kyseliny v omezeném rozsahu rychlostí. Všechny kyseliny, kromě LCA (nebyla studována), poskytly katodický pík a při vyšších rychlostech při zpětném anodickém scanu protipík, který byl pro CA pozorován od  $1280 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  a byl obrácen do anodické oblasti. Pro GCA byl anodický pík obrácen do katodické oblasti a pozorován od rychlosti

$40 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . DCA poskytovala anodický protipík, který byl od rychlosti  $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  obrácen do katodické oblasti, od  $80 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  do anodické oblasti. Od  $640 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  poskytovala anodický protipík obrácený do anodické oblasti UDCA. Toto chování napovídá, že elektrodovým dějem, který způsobuje katodický signál, by mohla být redukce protonu karboxylové skupiny na vodík, adsorbovaný na povrch elektrody; při vyšších rychlostech pak může docházet k jeho zpětné oxidaci, která je příčinou vývinu anodického signálu. Vývin vodíku jako příčina katodické redukce je znám pro některé alifatické a aromatické kyseliny, které nejsou aktivovány skupinami s výrazným záporným indukčním či mezomerním efektem a neobsahují snadněji redukovatelnou skupinu, a to ve vodných i nevodných prostředích [68,69]. Při vyšších rychlostech poskytuje DCA dvojpík, který je zřejmě způsoben silnou adsorpcí látky na povrch elektrody. Dále pro všechny zkoumané žlučové kyseliny platí, že při všech rychlostech scanu dochází ke katodickému úniku elektrolytu v přítomnosti žlučové kyseliny později než základního elektrolytu. Potenciál úniku základního elektrolytu je inhibován zřejmě v důsledku adsorpce kyselin na povrch elektrody. Ta byla prokázána pro koncentrace žlučových kyselin nižší než CMC, pomocí polarografického měření za snížení vířivého maxima kyslíku. Jejich schopnost adsorpce na povrch elektrody roste v pořadí monohydroxy < dihydroxy < trihydroxy žlučové kyseliny [70].

Dále byla studie omezena na kyselinu glykocholovou, která poskytovala reprodukovatelné a dobře vyhodnotitelné redoxní signály.

Nejprve byl studován vliv množství methanolu na voltametrickou odezvu GCA v prostředí BR pufru o pH 9,0 a proměnlivého množství methanolu (5 %; 6 %, 8 % a 10 %) metodou DP voltametrie. Bylo zjištěno, že přítomnost methanolu v roztoku ovlivňuje elektrochemickou odezvu základního elektrolytu i GCA. Děje se tak pravděpodobně proto, že dochází k adsorpci methanolu na povrch elektrody. S rostoucím množstvím methanolu se zkracuje potenciálové okno. Ke katodickému úniku elektrolytu tak dochází u kladnějších potenciálů katodické oblasti. Přítomnost GCA v roztoku naopak vedla k posunu katodického úniku elektrolytu k zápornějším hodnotám katodické oblasti oproti základnímu elektrolytu. Přítomnost methanolu dále ovlivňuje tvar píků GCA. S rostoucím množstvím methanolu dochází k narovnávání linie signálu, což stěžuje identifikaci píků. V přítomnosti methanolu není možné sestavit

na m-AgSAE lineární kalibrační závislost. Metodu DPV ve směsném prostředí Brittonova-Robinsonova pufru (pH 4,0 a 9,0), nebo borátového pufru (pH 9,0), a methanolu tedy nelze použít ke stanovení, ale pouze k určení přítomnosti GCA v roztoku.

Ve vodném prostředí bez podílu organické složky nebyl na m-AgSAE pro GCA získán žádný signál. Proto bylo zkoušeno další rozpouštědlo, konkrétně tetrahydrofuran.

Kyselina glykocholová byla rozpuštěna v THF a měřena ve směsném prostředí BR pufru a THF o pH 4,0 a 9,0. Poměr THF k vodné složce byl opět 1:9. V pH 9,0 nelze sestavit lineární kalibrační závislost na m-AgSAE ani v případě, že je místo BR pufru použit borátový pufr. Naopak pro GCA v prostředí BR pufru a THF (9:1) o pH 4,0 lze sestavit kalibrační závislost, která je v rozmezí koncentrací  $2,5 \cdot 10^{-5}$  až  $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  lineární. LOD pro GCA za těchto podmínek je  $1,65 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a LOQ  $5,45 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Předpokládaná adsorpce GCA na povrch elektrody může ovlivnit přenos elektronů pro další elektroaktivní systémy. Proto byla elektrochemická odezva redoxního markeru  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$ , (který zpravidla poskytuje reversibilní odezvu v oblasti potenciálů  $-100 \text{ mV}$  až  $-300 \text{ mV}$  v závislosti na použité referenční elektrodě, což je v rozsahu potenciálového okna m-AgSAE,) studována v přítomnosti a nepřítomnosti GCA. Měření probíhalo metodou CV s rychlostí  $320 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  v roztoku tvořeném chloridem draselným ( $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), BR puforem o pH 4,0 a methanolem (10 % roztoku). V přítomnosti kyseliny glykocholové a markeru v roztoku dochází k mírnému nárůstu proudu v maximu výšky píku oproti roztoku neobsahujícímu GCA. Přítomnost GCA neovlivňuje rychlost přenosu elektronu, jelikož hodnota rozdílu anodického a katodického píku v maximu výšky píků zůstává stejná. Vliv GCA na odezvu  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$  je nevýznamný.

Pro GCA bylo zkoumáno elektrochemické chování také na HMDE. Pro metodu DPV bylo zjištěno, že oproti m-AgSAE nelze na HMDE naměřit pík GCA v prostředí pH 3,0 a 4,0, jelikož k vývoji vodíku a úniku elektrolytu dochází v kladnějších potenciálech oproti předpokládanému výskytu píku. V pH 5,0 je na HMDE možno měřit pro GCA pík, který je podstatně vyšší oproti ostatním pH a jeho výška (proudová hustota) je srovnatelná s výškou píku v pH 5,0 na m-AgSAE. Ve všech pH dochází k úniku základního elektrolytu a elektrolytu kyseliny glykocholové přibližně

při stejných potenciálech, k zásadnějšímu rozdílu dochází pouze v pH 3,0, což je odlišné od chování na m-AgSAE, kde v roztocích majících kyselé pH dochází ke katodickému úniku základního elektrolytu v přítomnosti žlučové kyseliny při stejném či mírně kladnějším potenciálu, než leží katodický únik základního elektrolytu a v roztocích s pH od 5,0 až 6,0 je tomu naopak. Stejně jako na m-AgSAE dochází na HMDE k posunu potenciálového okna v zásaditých pH k zápornějším potenciálům.

Podstata elektrochemických dějů byla studována metodou CV. Katodický pík se nachází v oblasti úniku ZE a je obtížně vyhodnotitelný. Anodický protipík při reverzním scanu byl zaznamenán pro rychlosti 10 a 20  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  (obrácen do katodické oblasti) a od 640  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  (obrácen do anodické oblasti). Vzhledem k tomu, že s rostoucí rychlostí scanu se výška katodických píků snižuje, nelze říci, jakou reakcí je děj u pracovní elektrody řízen. Toto chování se naprosto odlišuje od měření na m-AgSAE, kde se výška píků s rostoucí rychlostí polarizace zvyšuje.

Provedením elektrolýzy GCA na rtuťovém dně a změřením RP-HPLC chromatogramu za použití UV detekce při 210 nm bylo dokázáno, že při potenciálu  $-1500\text{ mV}$ , který leží pro rtuťové dno záporněji než redukční pík GCA, nedochází k rozkladu GCA. Toto potvrzuje domněnku, že u žlučových kyselin během elektrochemických dějů dochází k redukci protonu karboxylové skupiny.

Metodou RP-HPLC byla také změřena koncentrační závislost GCA. Kalibrační závislost pro koncentrace  $3,33\cdot 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  až  $1\cdot 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  vykazuje linearitu. Pro tuto metodu je LOD  $1,65\cdot 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a LOQ  $5,45\cdot 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . LOD i LOQ pro stanovení metodou RP-HPLC pro GCA je tedy srovnatelný s LOD a LOQ pro metodu DPV na m-AgSAE, pokud je jako rozpouštědlo použit THF.

Závěrem tedy lze konstatovat, že studované žlučové kyseliny vykazují na m-AgSAE elektrochemickou aktivitu při vysoce záporných potenciálech blízko oblasti úniku základního elektrolytu, stejně jako kyselina glykocholová na HMDE. Jejich voltametrické chování je ovlivněno adsorpcí na povrch elektrody. Ačkoliv využití elektrochemické redukce žlučových kyselin pro jejich voltametrické stanovení se nejeví jako příliš vhodné, redukční signál zřejmě způsobený přítomností karboxylové skupiny ve struktuře žlučové kyseliny, lze použít k ověření přítomnosti žlučové kyseliny v roztoku. Z hlediska studia supramolekulárních interakcí skýtá tato redukce potenciální



možnost odlišit volné žlučové kyseliny od jejich konjugátů odvozených od derivatizace karboxylové kyseliny.

## Literatura

- [1] Mukhopadhyay S.; Maitra U.: Chemistry and biology of bile acids. *Current Science* **87**, 1666 – 1683 (2004)
- [2] Hofmann A. F.; Rods A.: Physicochemical properties of bile acids and their relationship to biological properties: An overview of the problem. *Journal of Lipid Research* **25**, 1477 – 1489 (1984)
- [3] Monte M. J.; Marin J. J. G.; Antelo A.; Vazquez-Tato J.: Bile acids: Chemistry, physiology, and pathophysiology. *World Journal of Gastroenterology* **15**, 804 – 816 (2009)
- [4] Hofmann A. F.; Sjövall J.; Kurz G.; Radomska A.; Schteingart C. D.; Tint G. S.; Vlahcevic Z. R.; Setchell K. D. R.: A proposed nomenclature for bile acids. *Journal of Lipid Research* **33**, 599 – 604 (1992)
- [5] Hofmann A. F.; Hagey L. R.: Bile acids: Chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**, 2461 – 2483 (2008)
- [6] Davis A. P.: Bile acid scaffolds in supramolecular chemistry: The interplay of design and synthesis. *Molecules* **12**, 2106 – 2122 (2007)
- [7] Tamminen J.; Kolehmainen E.: Bile acids as building blocks of supramolecular hosts. *Molecules* **6**, 21 – 46 (2001).
- [8] Virtanen E.; Kolehmainen E.: Use of bile acids in pharmacological and supramolecular applications. *European Journal of Organic Chemistry*, 3385 – 3399 (2004)
- [9] Roda A.; Minutello A.; Angellotti M. A.; Finit A.: Bile acid structure-activity relationship: Evaluation of bile acid lipophilicity using I-octanol/water partition coefficient and reverse phase HPLC. *Journal of Lipid Research* **31**, 1433 – 1443 (1990)
- [10] Hofmann A. F.; Rods A.: Physicochemical properties of bile acids and their relationship to biological properties: an overview of the problem. *Journal of Lipid Research* **25**, 1477 – 1489 (1984)
- [11] Stamp D.; Jenkins G.: An overview of bile-acid synthesis, chemistry and function. In: *Issues in Toxicology*, Royal Society of Chemistry, Cambridge (2008), 1 – 13

- [12] Paumgartner G.; Beuers U.: Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: Mechanisms of action and therapeutic use revisited. *Hepatology* **36**, 525 – 53 (2002)
- [13] Nakamura R.; Takeuchi R.; Kuramochi K.; Mizushima Y.; Ishimaru C.; Takakusagi Y.; Takemura M.; Kobayashi S.; Yoshida H.; Sugawara F.; Sakaguchi K.: Chemical properties of fatty acid derivatives as inhibitors of DNA polymerases. *Organic and Biomolecular Chemistry* **5**, 3912 – 3921 (2007)
- [14] [http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB9263222.htm](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB9263222.htm), 20. 04. 2015
- [15] [http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/cholic\\_acid#section=IUPAC-Name](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/cholic_acid#section=IUPAC-Name), 20. 04. 2015
- [16] <http://www.drugbank.ca/drugs/DB02659>, 20. 04. 2015
- [17] [http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB8378590.htm](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB8378590.htm), 20. 04. 2015
- [18] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10140#section=Top>, 20. 04. 2015
- [19] <http://www.drugbank.ca/drugs/DB02691#identification>, 20. 04. 2015
- [20] [http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB8325514.htm](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB8325514.htm), 20. 04. 2015
- [21] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/222528#section=Top>, 20. 04. 2015
- [22] <http://www.drugbank.ca/drugs/DB03619>, 20. 04. 2015
- [23] [http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB1285736.htm](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB1285736.htm), 20. 04. 2015
- [24] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/31401#section=Top>, 20. 04. 2015
- [25] <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01586>, 20. 04. 2015
- [26] [http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB2342229.htm](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB2342229.htm), 20. 04. 2015
- [27] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9903#section=Top>, 20. 04. 2015
- [28] Wu Y.; Wang X.; Wu Q.; Wu X.; Lin X.; Xie Z.: Separation and determination of structurally related free bile acids by pressurized capillary electrochromatography coupled to laser induced fluorescence detection. *Analytical Methods* **2**, 1927 – 1933 (2010)

- [29] Scalia S.: Bile acid separation. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications* **671**, 299 – 317 (1995)
- [30] Griffiths W. J.; Sjövall J.: Bile acids: Analysis in biological fluids and tissues. *Journal of Lipid Research* **51**, 23 – 41 (2010)
- [31] Ye L.; Liu S.; Wang M.; Shao Y.; Ding M.: High-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of bile acid profiles in serum of women with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications* **860**, 10 – 17 (2007)
- [32] Scalia S.; Salvatore Tirendi S.; Paolo Pazzi P.; Ennio Bousquet E.: Assay of free bile acids in pharmaceutical preparations by HPLC with electrochemical detection. *International Journal of Pharmaceutics* **115**, 249 – 253 (1995)
- [33] Araki Y.; Mukaisyo K.; Sugihara H.; Fujiyama Y.; Hattori T.: Detection of N-nitroso-bile acids at 285 nm in reverse-phase HPLC; *Journal of Separation Science* **31**, 2827 – 2830 (2008)
- [34] Sardella R.; Gioiello A.; Ianni F.; Venturoni F.; Natalini B.: HPLC/ELSD analysis of amidated bile acids: An effective and rapid way to assist continuous flow chemistry processes; *Talanta* **100**, 364 – 371(2012)
- [35] Krmela A.; Krtková V.; Schulzová V.: Vývoj UPLC-ELSD metody pro stanovení polysacharidu inulinu. *Chemické Listy* **107**, 243 – 246 (2013)
- [36] Chaplin M. F.: Analysis of bile acids and their conjugates using high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection, *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications* **664**, 431 – 434 (1995)
- [37] Campanella L.; Sorrentino L.; Tomassetti M.: Cholate Liquid Membrane Ion-selective electrode for drug analysis. *Analyst* **108**, 1490 – 1494 (1983)
- [38] Pecková K.; Nesměrák K.: Electrochemistry of bile acids, cholesterol, and related compounds. In: *Sensing in Electroanalysis*, Vol. 7. Kalcher K.; Metelka R.; Švancara I.; Vytřas K. (Eds.), University Press Centre, Pardubice (2012), 87 – 96.
- [39] Ferri T.; Campanella L.; De Andelis G.: Differential-pulse polarographic determination of cholic acids; *Analyst* **109**, 923 – 925 (1984)

- [40] Egawa Y.; Ishida Y.; Yamauchi A.; Anzai J.; Suzuki I.: Recognition of bile acids at cyclodextrin-modified gold electrodes. *Analytical Sciences* **21**, 361 – 366 (2005)
- [41] Bartling B.; Li L.; Liu C.-C.: Determination of total bile acid levels using a thick-film screen-printed Ir/C sensor for the detection of liver disease. *Analyst* **134**, 973 – 979 (2009)
- [42] Liu X.; Wang L.; Zhang S.; Deng X.; Tang X.; Huang X.: Electrochemical behavior of deoxycholic acid on Multiwalled Carbon Nanotubes Modified Electrode. *Electroanalysis* **18**, 2385 – 2388 (2006)
- [43] Barek J.; Opekar F.; Štulík K.; In: *Elektroanalytická chemie*, Univerzita Karlova v Praze, Karolinum, Praha (2005)
- [44] Wang J.; In: *Analytical Electrochemistry*, 3rd ed. John Wiley & Sons, New Jersey (2006)
- [45] Nicholson R. S.: Theory and application of cyclic voltammetry for measurement of electrode reaction kinetics. *Analytical Chemistry* **37**, 1351 – 1355 (1965)
- [46] Kissinger P. T.; Heineman W. R.: Cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education* **60**, 702 – 706 (1983)
- [47] Ross J. W.; De Mars R. D.; Shain I.: Analytical applications of hanging mercury drop electrode. *Analytical Chemistry* **28**, 1768 – 1771 (1956)
- [48] Bond A. M.; O'Donnell T. A.; Taylor R. J.: Direct current, alternating current, pulse, and anodic stripping voltammetric methods with glassy carbon electrodes in hydrofluoric acid. *Analytical Chemistry* **46**, 1063 – 1068 (1974)
- [49] Sujaritvanichpong S.; Aoki K.; Tokuda K.; Matsuda H.: Voltammetry at microcylinder electrodes: Part IV. Normal and differential pulse voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **199**, 271 – 283 (1986)
- [50] Vyskočil V.; Barek J.; Mercury electrodes – Possibilities and limitations in environmental electroanalysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **39**, 173 – 188 (2009)
- [51] Šelešovská R.; Bandžuchová L.; Navrátil T.: Voltammetric behavior of methotrexate using mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode. *Electroanalysis* **23**, 177 – 187 (2011)

- [52] Barek J.; Fogg A. G.; Muck A.; Zima J.: Polarography and voltammetry at mercury electrodes. *Critical reviews in analytical chemistry* **31**, 291 – 309 (2001)
- [53] Yosypchuk B.; Novotný L.: Nontoxic electrodes of solid amalgams. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **32**, 141 – 151 (2002)
- [54] Novotný L.; Yosypchuk B.: Solid silver amalgam electrodes. *Chemické Listy* **94**, 1118 – 1120 (2000)
- [55] Mikkelsen Ø.; Schrøder K.; Dental amalgam in voltammetry. Some preliminary results. *Analytical Letters* **33**, 3253 – 3269 (2000)
- [56] Yosypchuk B.; Novotný L.: Electrodes of nontoxic solid amalgams for electrochemical measurements. *Electroanalysis* **14**, 1733 – 1738 (2002)
- [57] Yosypchuk B.; Novotný L.: Nontoxic electrodes of solid amalgams. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **32**, 141 – 151 (2002)
- [58] Bandžuchová L.; Šelešovská R.; Navrátil T.; Chýlková J.: Electrochemical behavior of folic acid on mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode. *Electrochimica Acta* **56**, 2411 – 2419 (2011)
- [59] Barek J.; Fischer J.; Navrátil T.; Pecková K.; Yosypchuk B.; Zima J.: Nontraditional electrode materials in environmental analysis of biologically active organic compounds. *Electroanalysis* **19**, 2003 – 2014 (2007)
- [60] Yosypchuk B.; Barek J.: Analytical applications of solid and paste amalgam electrodes. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **39**, 189 – 203 (2009)
- [61] Danhel A.; Barek J.: Amalgam electrodes in organic electrochemistry. *Current Organic Chemistry* **15**, 2957 – 2969 (2011)
- [62] Rákosníková Š.: Studium elektrochemické redukce kyseliny deoxycholové a ursodeoxycholové na rtuťové visící kapkové elektrodě. *Bakalářská práce*. Univerzita Karlova v Praze (2014)
- [63] Patáková A.: Studium elektrochemické redukce kyseliny chenodeoxycholové na stacionárních elektrodách na bázi rtuti. *Bakalářská práce*. Univerzita Karlova v Praze (2013)
- [64] Compton R. G.; Banks C. E.: Cyclic voltammetry: Coupled homogeneous kinetics and adsorption. In: *Understanding voltammetry*, 2<sup>nd</sup> edition. Imperial College Press, London (2011), 278 – 283

- [65] Zhao J.; Wu L.; Zhi J.: Non-enzymatic glucose detection using as-prepared boron-doped diamond thin-film electrodes. *Analyst* **134**, 794 – 799 (2009)
- [66] Pišnová K.: Využití rtuťových elektrod ke stanovení kyseliny tauroursodeoxycholové. *Bakalářská práce*. Univerzita Karlova v Praze (2013)
- [67] [http://ach.upol.cz/user-files/files/nevodna\\_rozpoustedla2.pdf](http://ach.upol.cz/user-files/files/nevodna_rozpoustedla2.pdf), 30. 07. 2015
- [68] Coetzee J.F.; Kolthoff I. M.: Polarography in acetonitrile. III. Brønsted acids. Amperometric titration of amines with perchloric acid. Oxygen. *Journal of the American Chemical Society* **79**, 6110 – 6115 (1957)
- [69] Lund H.: Electroörganic preparations. XI. Reduction of isonicotinic acid in acid solution *Acta Chemica Scandinavica* **17**, 972 – 978 (1963)
- [70] Milberg C.; Kratochvil J. P.; Zuman P.: Surface orientation of cholanoic acids from suppression of polarographic maxima. *Journal of Colloid and Interface Science* **126**, 63 – 68 (1988)